AUTOREFERAT

Dr n. wet. Łukasz Sebastian Zielonka

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, Wydział Medycyny Weterynaryjnej

Olsztyn, 2015

Autoreferat

1. Imię i nazwisko

Łukasz Sebastian Zielonka

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/artystyczne z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej

1996 tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie).

1999 dyplom ukończenia podyplomowego studium pedagogicznego dla nauczycieli akademickich, Akademia Rolniczo-Techniczna w Olsztynie (obecnie Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie);

2001 dyplom ukończenia podyplomowych studiów specjalizacyjnych z zakresu prewencji weterynaryjnej i higieny pasz, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy;

2001 dyplom ukończenia studiów podyplomowych z informatyki, Wyższa szkoła Informatyki i Ekonomii Towarzystwa Wiedzy Powszechnej w Olsztynie;

2001 stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: „Próba określenia wartości diagnostycznych poziomu metabolitów deoxynivalenolu w surowicy krwi świń";

2003 dyplom ukończenia studiów podyplomowych z zakresu analityki w ochronie środowiska na Wydziale Chemii, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu;

2007 dyplom ukończenia studiów podyplomowych dla pracowników instytucji rynku pracy, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych

01.06.1996 – 30.04.2004 Katedra Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent;

01.05.2004 – do chwili obecnej Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt;

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz.595 ze zm.)

4.1. Tytuł osiągnięcia naukowego
„Obraz zmian w wybranych tkankach świni domowej *Sus domestica* i dzika *Sus scrofa* w przebiegu niskodawkowej mikotoksykozy fuzaryjnej."

Tworzy jedno-tematyczny cykl następujących publikacji:

4.2. publikacje oryginalne:

1. **Zielonka Ł**, Gajęcka M, Rozicka A, Dąbrowski M, Żmudzki J, Gajęcki M.: The Effect of Environmental Mycotoxins on Selected Ovarian Tissue Fragments of Multiparous Female Wild Boars at the Beginning of Astronomical Winter. Toxicon 89, 2014, 26-31; doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.021.

   MNiSW (2013) = 30 (Lista A); IF(2013) = 2,581

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, pobraniu próbek, wykonaniu części analiz laboratoryjnych, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

2. **Zielonka Ł.**, Gajęcka M., Żmudzki J, Gajęcki M.: The effect of selected environmental *Fusarium* mycotoxins on the ovaries in the female wild boar (*Sus scrofa*). Pol J Vet Sci 18(2), 2015, 391-399. DOI: 10.1515/pjvs-2015-0050

   MNiSW (2014) = 20 (Lista A); IF(2013) = 0,712

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, pobraniu próbek, wykonaniu części analiz laboratoryjnych, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 75%.

3. **Zielonka Ł**., Gajęcka M., Tarasiuk M., Gajęcki M.: The effects of dietary deoxynivalenol (DON) on selected blood biochemical and hematological parameters in pre-pubertal gilts. Pol J Vet Sci 18(1) (2015) 223-231. DOI 10.1515/pjvs-2015-0028

   MNiSW (2014) = 20 (Lista A); IF(2013) = 0,712

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, pobraniu próbek, wykonaniu części analiz laboratoryjnych, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 85%.

4. **Zielonka Ł**., Waśkiewicz A., Beszterda M., Kostecki M., Dąbrowski M, Obremski K., Goliński P., Gajęcki M.: Zearalenone in the Intestinal Tissues of Immature Gilts Exposed *per os* to Mycotoxins. Toxins 2015, *7*(8), 3210-3223; doi:10.3390/toxins7083210

   Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na opracowaniu koncepcji badań i zaplanowaniu eksperymentu, wykonaniu doświadczeń na zwierzętach, pobraniu próbek, wykonaniu części analiz laboratoryjnych, analizie statystycznej i interpretacji uzyskanych wyników, napisaniu wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 65%.

   MNiSW (2013) = 30 (Lista A); IF(2013) = 2,938

Łączna punktacja 4 prac wchodzących w skład jedno-tematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:

- wg listy czasopism punktowanych **MNiSW** – **100 pkt.**
- łączny współczynnik oddziaływania (**IF**) – **6,943**

Badania realizowano w ramach projektu badawczego własnego– *Ocena wybranych wskaźników rozrodczych i toksykologicznych w mieszanej mikotoksykozie fuzaryjnej świń* – N N311 608938 –projektu przyznanego przez MNiSW (w latach 2010-2013), kierownik dr n. wet. Łukasz Zielonka;

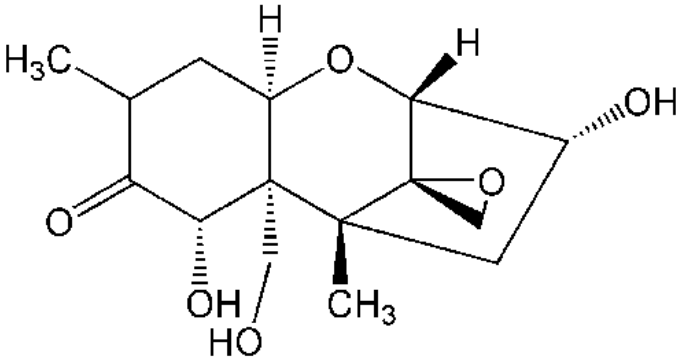
oraz z projektu rozwojowego pt. *Zwierzęta wolno żyjące jako wskaźnik zanieczyszczeń środowiskowych i ważny element w strategii bezpieczeństwa żywnościowego kraju* – NR12-0127-10/2010 –projektu przyznanego przez NCBiR (w latach 2011-2014), zadanie badawcze: *Mikotoksyny fuzaryjne ekosystemu leśnego i polnego a stan zdrowia zwierząt dziko-żyjących* – kierownik zadania badawczego– dr n. wet. Łukasz Zielonka;

4.3. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

4.3.1. Wprowadzenie

Grzyby pleśniowe należące do rodzaju *Fusarium* są jednymi z najczęściej spotykanych grzybów toksynotwórczych występujących w krajach o klimacie umiarkowanym (Streit et al. 2012). Te patogeny, porażają niemal wszystkie ważne gospodarczo gatunki roślin, a przez swoją aktywność biologiczną stwarzają zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt (Marin et al. 2013). W warunkach klimatycznych Europy Centralnej, wśród dużej grupy mikotoksyn produkowanych przez grzyby z rodziny *Fusarium,* na szczególną uwagę ze względu na częstotliwość występowania oraz znaczenie gospodarcze i wpływ na stan zdrowia ludzi i zwierząt mają deoxynivalenol (DON) i zearalenon (ZEN)(Schatzmayr and Streit 2013).

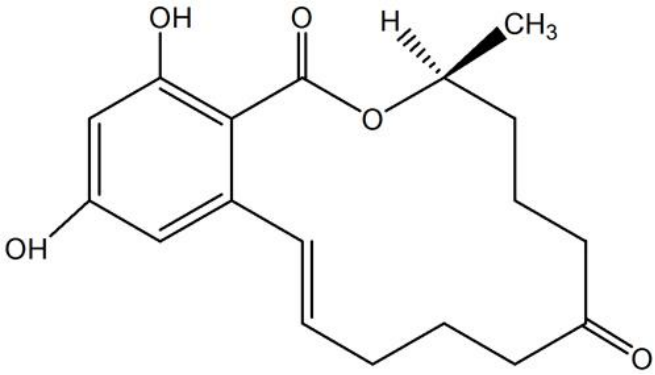
Deoxynivalenol należy do najczęściej oznaczanych trichotecenów grupy B i jest naturalnie występującą mikotoksyną produkowaną głównie przez *F. graminearum* i *F. culmorum*. Czynnikami sprzyjającymi powstawaniu DON, są przede wszystkim określona temperatura (21-25°C) oraz odpowiednia wilgotność zależna od gatunku patogenu. DON zwany jest także womitoksyną ze względu na wywoływanie odruchów wymiotnych występujące u zwierząt po spożyciu paszy zawierającej tą mikotoksynę (Pestka 2007). Strukturalnie DON jest polarnym związkiem organicznym o wzorze 12, 13-epoksy-3α, 7α, trichotech,15-trihydroksy-9-en-8-on. Ketonowa grupa w pozycji C8 jest charakterystyczna dla trichotecenów grupy B. Poprzez grupę epoksydową, mikotoksyna ta jest w stanie wiązać się z dużą liczbą podjednostek rybosomów eukariotycznych i zakłócać aktywność transferazy peptydowej, pogarszając procesy rozbudowy lub skracania łańcuchów peptydowych (Pestka and Smolinski 2005). DON charakteryzuje się takimi właściwościami jak np. wpływ na: szybkość transportu do komórek, metabolizm enzymów w cytoplazmie, zmiany w powinowactwie do aktywnego miejsca wiążącego lub zakłócania syntezy białek (Wu et al. 2014). Bardzo ważnym skutkiem oddziaływania DON jest wpływ na poziom białek tworzących połączenia ścisłe komórek nabłonkowych (Pestka 2010; Maresca 2013). Połączenia barierowe są kompleksami białkowymi, których aktywność decyduje o ścisłości (przyleganiu a w efekcie nieprzepuszczalności) pomiędzy ścianami przylegających enterocytów (komórek nabłonkowych) (Pinton et al. 2009; Akbari et al. 2014). Pomiar potencjału przeznabłonkowego (różnice elektrycznego potencjału przeznabłonkowego – TEER) jest ogólnie znaną metodą stosowaną do określenia spójności bariery jelitowej poprzez ocenę stanu połączeń ścisłych (barierowych) na poziomie enterocytów.



Wzór strukturalny deoxsynivalenolu

Głównym źródłem DON są grzyby pleśniowe porażające zboża, w tym pszenicę, jęczmień, kukurydzę, owies.

Zearalenon, zwany również toksyną F-2, jest trzecią spośród najczęściej spotykanych w tkankach roślin mikotoksyną, syntetyzowaną przez liczne gatunki *Fusarium*, głównie *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. semitectum*, *F. equiseti*, *F. cerealis* (Marin 2013). Warunki środowiska sprzyjające do syntezy ZEN to wilgotność ok. 16% i temperatura poniżej 25°C. Roślinami żywicielskimi - jednocześnie źródłem mikotoksyny - mogą być wszystkie gatunki zbóż drobnoziarnistych, kukurydza, ziemniaki, rośliny ozdobne i leśne oraz nasiona dyni, orzechy włoskie, oleje roślinne czy słód.



Wzór strukturalny zearalenonu

ZEN jest jedną z najsilniej działających, niesteroidowych substancji o charakterze estrogennym –mikoestrogenem, występującym w naturze (Zinedine et al. 2007). Związek ten, ze względu na obecność pierścienia fenolowego w swojej budowie chemicznej, wykazuje powinowactwo do receptorów estrogenowych (ERs) typu ERα lub ERβ oraz działanie kilkukrotnie silniejsze od naturalnie występującego estrogenu wywołując zaburzenia cyklu płciowego i przebiegu ciąży (Takemura et al. 2007). ZEN i jego metabolity α-zearalenol (α-ZEL) i β-zearalenol (β-ZEL), powodują zaburzenia w rozrodzie zwierząt, jednak różna jest wrażliwość poszczególnych gatunków na obecność tej mikotoksyny w paszy (Gajęcki 2002). α-ZEL jest dominującym metabolitem ZEN występującym w organizmie świń, podczas gdy u innych gatunków zwierząt jak np. u drobiu, krów i owiec dominującym produktem metabolizmu ZEN jest β-ZEL o dużo mniejszej aktywności metabolicznej. Efekt aktywności ZEN zależy od aktywności procesów metabolicznych mających miejsce w organizmie zwierząt oraz od statusu immunologicznego zwierząt.

Z badań opublikowanych przez Rodrigez (Rodrigez and Naehrer 2012) wynika że na 23 781 przeprowadzonych analiz w latach 2009 -2011 w 81 % próbek paszy i materiałów paszowych stwierdzono obecność co najmniej jednej mikotoksyny, przy czym wynik pozytywny uzyskano dla 45% próbek badanych w kierunku obecności ZEN i 59% badanych w kierunku obecności DON. Największe zagrożenia w krajach Europejskich stanowią porażone ziarna kukurydzy i pszenicy. Potwierdzają to dane z analizy kukurydzy z roku 2014 opracowane przez firmę BIOMIN. Udokumentowano 92% wyników pozytywnych w kierunku obecności DON i 80% w kierunku obecności ZEN, z max poziomem odpowiednio 11 320 µg/kg i 2 064 µg/kg.

Co również bardzo istotne w 56% próbek oznaczonych w kierunku DON stężenie przekraczało poziom rekomendowany przez EU jako bezpieczny (900 µg/kg). Ta sam wartość w przypadku ZEN wyniosła 47% (poziom rekomendacji 100 µg/kg).

Warto również zauważyć, że ustanowione na podstawie Zalecenia Komisji z dnia 17 sierpnia 2006 roku (2006/576/WE) rekomendacje w sprawie „obecności DON, ZEN, ochratoksyny A, T-2 i HT-2 oraz fumonizyn w produktach przeznaczonych do żywienia zwierząt" to jedyne uregulowania prawne na poziomie zalecenia wobec tego problemu, czyli to nie jest obowiązek prawny. W dodatku bardzo często krytykowane, ze względu na niedostosowanie rekomendacji do skali rzeczywistego narażenia zdrowia zwierząt.

Obecność mikotoksyn fuzaryjnych w materiałach paszowych oraz w paszy skarmianej u zwierząt, może powodować wystąpienie stanów chorobowych określanych jako mikotoksykozy (Murugesan 2015, Cheli 2015). Kliniczne objawy mikotoksykozy u zwierząt są zróżnicowane w zależności od stężenia mikotoksyny, gatunku zwierzęcia, jego stanu fizjologicznego, płci czy wieku (da Rocha et al. 2014). Znaczący wpływ na dynamikę i kierunek procesów będących wynikiem przyjęcia mikotoksyn ma również szereg interakcji zachodzących w organizmie zwierząt (Alassane-Kpembiet al. 2015). Są to zarówno interakcje pomiędzy mikotoksynami, jak również dwukierunkowe oddziaływanie mikotoksyny na przewód pokarmowy i treść w nim obecną (Speijers and Speijers 2004). Stąd też w zależności od zestawienia czynników środowiskowych interakcje te mogą mieć postać **:**

- ✓ synergistyczną (synergism) – jako wynik połączenia skutków działania mikotoksyn, ale dużo większy niż suma działania każdej mikotoksyny z osobna;
- ✓ addytywną (additives) – synergizm addycyjny – jako wynik połączenia skutków działania mikotoksyn, ale nie więcej niż suma działania każdej mikotoksyny z osobna;
- ✓ antagonistyczną (antagonism) – podane równocześnie dwie mikotoksyny przeszkadzają sobie nawzajem zmniejszając efekt toksyczny każdej z nich;
- ✓ wzmacniającą (potentiation - potencjalizacja) – synergizm hiperaddycyjny – wzmaganie działania mikotoksyny przez inną mikotoksynę – jedna mikotoksyna nie wywołuje skutku toksycznego, lecz obecność innej mikotoksyny powoduje wywołanie bardzo silnego skutku toksycznego, ale każda z nich ma inną formę działania (inny punkt uchwytu) np. aflatoksyny i fumonizyny czy zearalenon i trichoteceny .

W ocenie przebiegu interakcji, ważne jest również wzajemne oddziaływanie mikotoksyn na mikroflorę przewodu pokarmowego (Piotrowska et al. 2014). Istotność znaczenia biocenozy

przewodu pokarmowego w procesie biotransformacji mikotoksyn, obrazować może przykład zwierząt przeżuwających, które uznawane są za mniej wrażliwe na obecność mikotoksyn fuzaryjnych w paszy.

Objawy mikotoksykoz będących skutkiem przyjęcia dużych dawek toksyn fuzaryjnych są dobrze opisane i z reguły nie nastręczają dużych trudności diagnostycznych. Jednak w zdecydowanej większości przypadków, stężenie mikotoksyn obecnych w paszy jest zbyt niskie dla wywołania ostrego przebiegu mikotoksykozy (Pestka et al. 2004). Możemy mieć wtedy do czynienia z postacią podostrą, lub z mikotoksykozą w postaci subklinicznej. Bardzo często jedynym objawem przyjęcia niskich dawek mikotoksyn jest obniżenie produkcyjności zwierząt, spadek żerności, gorsze wskaźniki rozrodu, czy większa wrażliwość na czynniki środowiskowe (Pestka 2007).

Po wniknięciu do ściany jelit mikotoksyny dostają się do krwi i wraz z nią są rozprowadzane między innymi do narządów wrażliwych, gdzie mogą powodować określone zmiany patologiczne (Maresca 2013). W przewodzie pokarmowym mikotoksyny podlegają procesom biotransformacji w wyniku, której powstają często substancje bardziej toksyczne (np. α-ZEN) niż substancja macierzysta ZEN (Obremski et al. 2003). Dynamika i kierunek tych przemian zależy od dawki. Dawki niższe od wartości NOAEL (dawka nie wywołująca jeszcze objawów klinicznych) wywołują zupełnie inne objawy miejscowe i ogólne niż te do których jesteśmy przyzwyczajeni podczas mikotoksykoz prowokowanych dawkami powyżej wartości NOAEL (Gajęcka et al. 2011).

Dotyczy to zarówno zmian zachodzących w błonie śluzowej jelit, w poziomie miejscowej odpowiedzi immunologicznej, oraz tkanek o dużym stopniu wysycenia ERs (Przybylska et al. 2015).

Wśród zwierząt gospodarskich największą wrażliwość na obecność mikotoksyn fuzaryjnych w paszy stwierdzono u świń (Gajęcki 2002). Za przodków świni, uważa się podgatunek dzika europejskiego (*Sus scrofa*): *Sus scrofa scrofa*, który występował w Europie i północnej Afryce.

Dzik jest eurytopem, unika tylko terenów otwartych i górskich. Zasiedla głównie obszary o dużej lesistości, ponieważ w lasach znajduje pokarm oraz schronienie (Keuling et al. 2008). Dzik, dzięki swej plastyczności ekologicznej jest jednym z najważniejszych i najliczniejszych z grupy dużych ssaków bytujących w umiarkowanej strefy klimatycznej. Obserwuje się pojawianie dzików, w tym loch z warchlakami, na terenie miast gdzie przychodzą, aby żerować w śmietnikach i na wysypiskach (Keuling et al. 2009). Okres godowy, zwany u dzików *huczką*, w strefie klimatu umiarkowanego, trwa zimą – od listopada do stycznia. W cieplejszych regionach, gody mogą się odbywać o każdej porze roku. Dziki odgrywają istotną rolę w ekosystemach leśnych i polnych. W poszukiwaniu pokarmu zdzierają wierzchnie warstwy gleby, spulchniając ją i mieszając ze ściółką. Dziki zjadają padlinę, gryzonie oraz larwy i poczwarki owadów, w tym wielu szkodników lasu, przez co przyczyniają się do przywrócenia równowagi ekologicznej między światem owadów a drzewostanem. Dzisiejszą świnię, utrzymywaną w warunkach hodowli różni od dzika przede wszystkim sposób żywienia oraz przebieg cyklu płciowego. Świnie są żywione paszą pełnoporcjową wytworzoną z materiałów pochodzenia roślinnego. Podstawowym źródłem energii w paszy dla świń są węglowodany obecne w kukurydzy, pszenicy lub jęczmieniu. Cykl płciowy jest regularny (21 dniowy), a zwierzęta charakteryzują się wysoką płodnością.

Czynnikiem bardzo istotnym jest potencjalna możliwość oddziaływania na zwierzęta mikotoksyn (mikoestrogenów) obecnych w paszach gotowych i naturalnych. Ilości tych mikotoksyn są sezonowo (pory roku) zależne. Wstępne badania wykazały występujące często, zróżnicowane wartości stężeń ZEN i DON w paszach komercyjnych i naturalnych, przy czym w niektórych przypadkach sięgają one bardzo wysokich koncentracji (Rodrigues and Naehrer 2012). Znaczenie obecności ZEN i/lub DON w paszach pogłębia fakt, iż wobec świniowatych często jest praktykowana monodieta przez wiele tygodni (na fermach) lub zależnie od pory roku są stałe niskie wartości mikotoksyn w materiale roślinnym (Vandenberg et al. 2012). Jak wiadomo, ZEN charakteryzuje się działaniem estrogennym, ale również jest czynnikiem zakłócającym procesy hormonalne, zaś loszki są zwierzętami szczególnie wrażliwymi na działanie tych hormonów (Metzler et al. 2010). Podwyższone stężenie estrogenów endogennych i/lub egzogennych (dające w sumie hyperestrogenizm) jest także uznawane za przyczynę wielu innych zaburzeń ustrojowych (Zinedine et al. 2007). Dlatego też, długotrwałe pobieranie karm zawierających ZEN może być czynnikiem powodującym zaburzenia hormonalnej regulacji procesów rozrodczych oraz dysfunkcji jajników i macicy. Powszechnie wiadomo, że narządami szczególnie wrażliwymi na oddziaływanie substancji o właściwościach estrogennych są jajniki i macica, w których łatwo dochodzi do powstawania trwałych zmian towarzyszących np. torbieli jajnikowych i/lub spontanicznych endometrioz (Jakimiuk et al. 2010). W związku z tym efekt narażenia ZEN może być dwukierunkowy: (i) ze strony organu tropowego; czy (ii) ze strony funkcjonalnie zmienionej tkanki (komórki), co ma lub może mieć wpływ na inne organy lub cały organizm.

Celem wykonanych badań była ocena stopnia przeniesienia (carry-over factor) ZEN i jego wybranych metabolitów z treści pokarmowej do ściany jelit (na całej ich długości) niedojrzałych płciowo loszek, podczas monotonicznego, długoterminowego narażenia niską dawką zearalenonu; określenie kierunku i dynamiki zmian w obrazie hematologicznym i biochemicznym surowicy krwi w przebiegu intoksykacji niskimi dawkami DON; określenie możliwości wpływu obecności mikotoksyn fuzaryjnych pobieranych z naturalnie skażoną karmą na funkcjonowanie układu rozrodczego na podstawie wskaźników wartości indeksu proliferacyjnego i apoptotycznego pęcherzyków jajnikowych samic dzików; określenie wartości stężeń mikotoksyn fuzaryjnych u dzików na przestrzeni roku kalendarzowego; określenie poziomu mikotoksyn fuzaryjnych w organizmie samic dzika i ich wpływ na histologiczną strukturę jajników w początkowym okresie astronomicznej zimy.

4.3.2. Materiały i metody

Czynności związane z wykonywaniem doświadczeń na zwierzętach przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych. Badania na zwierzętach przeprowadzono w Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Maurskiego w Olsztynie. Do badań użyto:

a. 50 dzików odstrzelonych w regionie północno-wschodniej Polski.

   Próbki pochodziły z odstrzałów planowanych w kołach łowieckich, czterokrotnie w roku: pierwszy kwartał roku (astronomiczna wiosna); drugi kwartał roku (astronomiczne lato); trzeci kwartał roku (astronomiczna jesień); czwarty kwartał roku (astronomiczna zima).

b. 75 kliniczne zdrowych niedojrzałych płciowo loszek o początkowej masie ciała ok 25 kg ± 2 kg.

W trakcie doświadczenia zwierzęta podzielono losowo na III grupy po 25 świń i podawano *per os* codziennie przez okres 42 dni ZEN w dawce 40 µg/kg masy ciała (grupa I). Świnie z II grupy otrzymywały codziennie przez okres 42 dni DON w dawce 12 µg/kg masy ciała. Grupa III (kontrolna) otrzymywała placebo.

W przebiegu doświadczeń wykonano następujące oznaczenia:

a. od odstrzelonych dzików pobierano próbki krwi do badań poziomu ZEN i jego metabolitów oraz DON a także próbki tkanek do oznaczeń immunohistochemicznych (PCNA i Tunel test) i badań histologicznych jajników samic dzika.

b. w każdej grupie doświadczalnej poddawano eutanazji 3 loszki w każdym tygodniu doświadczenia i oznaczano poziom ZEN i jego metabolitów we krwi i w tkankach przewodu pokarmowego: dwunastnicy, jelicie czczym, jelicie biodrowym, jelicie ślepym, okrężnicy (wszystkie trzy odcinki) i w wątrobie, oraz pobierano próbki do oznaczeń wskaźników biochemicznych i morfologicznych krwi.

Badania hematologiczne wykonano za pomocą analizatora hematologicznego (Medonic) wg metodyki zalecanej przez producenta. Badania biochemiczne surowicy krwi wykonano przy użyciu automatycznego analizatora biochemicznego typu ACCENT-200 firmy Cormay z użyciem firmowych odczynników. Poziom mikotoksyn i ich metabolitów oznaczono stosując łączone techniki separacji z użyciem kolumienek powinowactwa immunologicznego (Zearala-TestTM, G1012, VICAM, Watertown, USA; DON-Test^{TM} DON Testing System, VICAM, Watertown, USA) oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) w połączeniu z detektorem mas (LC-MS) i z detektorem UV.
Metodykę immunohistochemiczną wykorzystano do oznaczenia obecności antygenu PCNA w jądrach komórkowych za pomocą przeciwciała monoklonalnego, mysiego, anty-PCNA (Dako). Metodą TUNEL oznaczono indukcję apoptozy w hodowlach komórek ziarnistych.
W badaniach histologicznych wykorzystano barwienie HE i PAS wg metody opisanej przez McManusa.

4.3.3. Wyniki i dyskusja

4.3.3.1. **Ocena wpływu mikotoksyn fuzaryjnych na budowę histologiczną jajnika u samic dzika w okresie początku astronomicznej zimy.**

Podczas badań histologicznych jajnika stwierdzano liczne pęcherzyki w różnym stopniu rozwoju i w różnym stopniu uszkodzenia. Stwierdzono atrezję pęcherzyków jajnikowych, obecność uszkodzonych oocytów, pojawianie się komórek różnokształtnych w wieńcu promienistym oraz powstawanie pęcherzyków z uszkodzoną osłonką. Skupiska pęcherzyków pierwotnych były regularnie rozmieszczone w zewnętrznej części kory. Bezpośrednio pod nabłonkiem stwierdzano liczne zdeformowane pęcherzyki spoczynkowe. Pakiety zawierały od kilku do kilkunastu pęcherzyków spoczynkowych, rozmieszczone regularnie, rozdzielone grubymi pasmami tkanki łącznej. Część korowa była bardzo cienka. W części przyrdzeniowej występowały liczne pęcherzyki atrezyjne, różnej wielkości, kształtu – od okrągłego do podłużnego, rozmieszczone pojedynczo lub w pakietach, ich wielkość zmniejszała się proporcjonalnie w kierunku rdzenia. Charakterystyczną cechą kory jajników samic dzika była obecność licznych naczyń włosowatych ze znacznie rozszerzonym światłem oraz znacznymi wynaczynieniami krwi. Wtórne pęcherzyki rzadko można było zauważyć. Stwierdzano

występowanie obumarłych komórek warstwy ziarnistej pęcherzyka jajnikowego jak i brak warstwy ziarnistej w pęcherzykach jajnikowych oraz obecność zgrubień warstwy ziarnistej, złożonej z różnokształtnych komórek w dużych pęcherzykach jajnikowych. Pęcherzyki atrezyjne były różnych kształtów. Występowały pojedynczo lub w skupiskach a ich wielkość wzrastała w kierunku rdzenia.

ZEN i jego metabolity (a szczególnie α-ZEL) łączą się z ERα i ERβ. Konsekwencją dalszą są zmiany anatomopatologiczne np. w jajniku, co jest przedmiotem prezentowanej pracy. ZEN i jego metabolity są agonistami wobec ER-α i częściowymi antagonistami wobec ER-β. Jednakże zdolność wiązania się ZEN z ERs jest od 10 do 100x mniej skuteczna niż E_2, lecz α-ZEL zdolność wiązania ma 20x większą od ZEN. W sytuacji, gdy dawki mieszczą się poniżej wartości NOAEL, zewnętrzne procesy fizjologiczne w układzie rozrodczym świń przebiegają normalnie. Brak jest objawów klinicznych mikotoksykozy zearalenonowej. Jednakże podczas narażenia na niskie stężenia ZEN ma miejsce np. zmiana wartości koncentracji hormonów sterydowych. Zaistniała sytuacja może być prowokowana również faktem, że w organizmach żeńskich będących w końcowym etapie fazy *anestrus* (w okresie letnim i wczesno wiosennym) fizjologicznie koncentracja P_4 powinna być bardzo niska, co nie sprzyja biotransformacji ZEN do α-ZEL. Z innych badań wynika, że obecność ZEN i jego metabolitów jest przyczyną zwiększenia ekspresji receptora progesteronu, który jest pobudzany przez E_2. Z kolei odwrotnie proporcjonalnie do dawki α-ZEL ma miejsce zmniejszenie syntezy sterydów w komórkach ziarnistych jajników świń, przez wyhamowanie aktywności P450scc. Ten efekt antysteroidogenny tłumaczy się właściwościami cytotoksycznymi ZEN i α-ZEL.

Równocześnie w okresie późnej jesieni i wczesnej zimy ma miejsce pobieranie paszy o wysokiej zawartości łatwo strawnych węglowodanów, które mają krótki czas retencji w przewodzie pokarmowym. Zwiększenie poziomu energii w organizmie dzików jest czynnikiem sprzyjającym do wzmożenia aktywności antyportowej. Jest to bardzo istotne w pierwszym okresie trwania procesu metabolizmu mikotoksyn. Proces z udziałem białek antyportowych jest zależny od obecności związków energetycznych, które w sposób jednoznaczny wpływają na działalność aktywnej pompy jonowej wyrzucającej poza komórkę ZEN, w wyniku, czego spada koncentracja ZEN w przestrzeniach wewnątrzkomórkowych. Zaistniała sytuacja jest czynnikiem sprzyjającym do zwiększenia stężenia IGF-I, co sprzyja uwalnianiu gonadotropin, ale również steroidów płciowych.

Stała obecność ZEN w materiale roślinnym pobieranym przez samice dzików pod koniec jesieni i na początku astronomicznej zimy powoduje pogłębienie fazy *anestrus* w jej końcowych terminach. Stan ten jest prawdopodobnie początkowo prowokowany wazodylatacją naczyń krwionośnych jajnika, co wpływa na zwiększenie kontaktu ZEN z tkankami estrogeno-wrażliwymi. Zaistniała sytuacja może powodować wstrzymanie rozwoju pęcherzyków jajnikowych, ich atrezję, a w końcowym etapie hialinizację pęcherzyków jajnikowych, co jest czymś normalnym u samicy dzika ale tylko na początku ostatniego etapu fazy *anestrus*.

Szczegółowe wyniki i ich omówienie przedstawiono w pracy nr 1.

4.3.3.2. **Narażenie dzików na mikotoksyny fuzaryjne na przestrzeni roku kalendarzowego i wpływ intoksykacji na jajniki samicy dzika.**

Rozpatrując jakikolwiek problem zdrowotny u dzików lub zoonoz, których wektorem są dziki należałoby poruszyć problem ich środowiskowego, czy może ekotonowego umiejscowienia. Jest to o tyle ważne, że trudno dziki przypisać do jednego środowiska ekologicznego. W chwili obecnej wzrasta populacja dzików nie tylko w naszym kraju. Efektem tego, spada możliwość tzw. tolerancji fizycznej i konkurencyjności w ekosystemie leśnym i dziki zaczynają coraz bardziej energicznie poszukiwać środków żywienia w ekosystemie polnym, łąkowym czy w osiedlach ludzkich. Z powodu, że ekotony

są to wąskie strefy o dość labilnej granicy, stały się one globalnym wskaźnikiem zmian klimatycznych oraz „przejściem granicznym" pomiędzy różnymi ekosystemami

Analiza toksykologiczna wykazała obecność ZEN i jego metabolitów we wszystkich grupach badanych zwierząt. W przypadku DON stwierdzano wartości mieszczące się poniżej czułości metody.

Oceniając uzyskane wyniki badań należałoby się chwilę zastanowić nad wartościami ZEN i jego metabolitów we krwi obwodowej dzików. Są one wszystkie bardzo niskie, ale co charakterystyczne są statystycznie różne we wszystkich porach roku w porównaniu do wartości w porze letniej. U dzików stwierdzono najwyższe wartości ZEN i jego metabolitów w okresie zimowym, kiedy pod koniec tego astronomicznego okresu zbliża się czas porodów, co może być przyczyną zwolnienia procesów proliferacyjnych a wzmożenia procesów apoptotycznych, czyli ma miejsce korelacja ujemna między koncentracją ZEN a aktywnością owulacyjną, ponieważ wiosną i latem lochy najczęściej są w fazie anestrus.

Badania immunohistochemiczne.

Podczas badań immunohistochemicznych, opracowano wyniki jądrowej ekspresji białka PCNA i reakcji TUNEL. Na tej podstawie przedstawiono indeks proliferacyjny (PI) i indeks apoptotyczny (AI).

Z zestawienia wyników PI wybranych struktur jajników samic dzika wynika, że procesy proliferacyjne najsilniej były wyrażone w próbkach od dzików pozyskanych w okresie jesieni. Najwyższe wartości PI stwierdzano w badanych oocytach we wszystkich grupach doświadczenia, w pęcherzykach wzrastających w próbkach pozyskanych w okresie lata oraz wśród badanych pęcherzyków atrezyjnych w próbkach pozyskanych jesienią. Najniższe wartości PI stwierdzano w strukturach pęcherzyków pierwotnych pozyskanych zimą i wiosną oraz w strukturach pęcherzyków atrezyjnych z okresu wiosny i lata.

W wynikach AI stopień aktywności typu A (bardzo niski) stwierdzono w przypadku pęcherzyków pierwotnych i rozwijających we wszystkich grupach doświadczenia z tym, że z okresu jesieni wartości AI były najniższe. Wartości mieszczące się w stopniu aktywności typu B (niski) stwierdzono tylko w przypadku oocytów. Z kolei stopień aktywności typu C (wysoki) stwierdzono w strukturach oocytu z okresu lata oraz we wszystkich grupach doświadczenia w pęcherzykach atrezyjnych. Najwyższy stopień aktywności, czyli bardzo wysoki (D) stwierdzano w wartościach AI oocytów pozyskanych zimą i wiosną.

U dzików (w przeciwieństwie do świń hodowlanych) ma miejsce sezonowość rozrodu. Oprócz wielu innych czynników, wpływ na to ma również czas trwania doby świetlnej oraz dostępność do materiałów odżywczych. Oba te czynniki wpływają na kondycję rozpłodową dzików. Istotne jest również pobranie wraz z materiałem roślinnym mikotoksyn fuzaryjnych. Im więcej zwierzęta pobierają materiału roślinnego tym więcej pobierają ZEN. W efekcie w okresie jesienno-zimowym osiągają najlepsze warunki kondycyjne i hormonalne do prokreakcji. Z drugiej strony jest to czas sprzyjający temu by porody odbywały się w okresach najbardziej sprzyjających dla noworodków i ich matek. Potwierdzają to najwyższe wartości PI jak i wartości AI które są najniższe w okresie jesiennym.

Szczegółowe wyniki i ich omówienie przedstawiono w pracy nr 2.

4.3.3.3 Oznaczenia wskaźników biochemicznych i morfologicznych krwi w przebiegu niskodawkowej intoksykacji DON.

W wyniku przeprowadzonego doświadczenia stwierdzono statystycznie istotne zmiany w wartościach wybranych wskaźników, głównie w II i III terminie pobierania próbek we wskaźnikach biochemicznych krwi takich jak, AlAT, AspAT, P_{in} czy Fe oraz we wskaźnikach hematologicznych takich

jak WBC, liczba neutrofili, eozynofili, limfocytów i monocytów oraz RBC, MCV, MCHC, PLT, MPV. W grupie doświadczalnej w większości przypadków tendencje były malejące z wyjątkiem wartości PLT, eozynofili, limfocytów, monocytów i RBC. Podobna sytuacja miała miejsce w dwóch ostatnich terminach badań. W pierwszym okresie narażenia miała miejsce reakcja organizmu na czynnik toksyczny, który to stan był następnie przywracany do normy przez uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych.

Szczegółowe wyniki i ich omówienie przedstawiono w pracy nr 3.

4.3.3.4. ZEN

Układ pokarmowy będący głównym miejscem wchłaniania, metabolizmu i dystrybucji mikotoksyn jest najbardziej narażony na toksyczne działanie mikotoksyn, w tym ZEN oraz jego metabolitów. Wyniki analiz chromatograficznych tkanek układu pokarmowego, pozyskanych od niedojrzałych płciowo loszek poddanych narażeniu ZEN, wskazują na znaczne zróżnicowanie poziomów mikotoksyny w zależności od badanego odcinka układu pokarmowego, jak i od czasu trwania narażenia. Większość mikotoksyn fuzaryjnych jest wchłaniana w największym stopniu w proksymalnej części jelit cienkich. Spowodowane to jest dużą zmiennością fizjologiczną poszczególnych odcinków jelit, np. zmianą ilości glikoprotein śluzu, których w odcinku dwunastnicy i jelita czczego jest najmniej, co jest przyczyną największej fizycznej dostępność treści pokarmowej do enterocytów. Równocześnie większość węglowodanów jest absorbowana w proksymalnej części jelit cienkich, co ma bardzo istotny wpływ wspomagający, na procesy wchłaniania i biotransformacji ZEN na poziomie enterocytów podczas podawania *per os* czystej substancji macierzystej.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono największe wysycenie(%) ZEN w jelicie cienkim w początkowych terminach narażenia (I-III). W pozostałych terminach ZEN kumulował się również w dwunastnicy w okrężnicy zstępującej. W IV terminie narażenia najwyższe wartości CF (carry-over factor –stopień przeniesienia) stwierdzano w jelicie czczym i okrężnicy zstępującej. W dwóch ostatnich terminach narażenia ZEN, najwyższe wartości stwierdzano w dwunastnicy i okrężnicy zstępującej. Z przedstawionych danych wynika, że dwunastnica wraz z jelitem czczym i okrężnicą zstępującą są odcinkami jelit loszek niedojrzałych płciowo, w których kumulowało się najwięcej ZEN.

Wartości stężeń α-ZEL i β-ZEL były poniżej czułości metody. W sytuacji narażenia ZEN (w dawce NOAEL) procesy biotransformacji w przewodzie pokarmowym lub w tkankach jelit przebiegają w stopniu nieznacznym. Dowodem na to jest brak pozytywnych wyników badań toksykologiczno-biochemicznych na obecność α-ZEL i β-ZEL. Z kolei proces wysycania tkanek jelit ZEN rozpoczyna się już w 1. tygodniu narażenia, proces ten przebiega dużo szybciej, porównując go do podobnych wyników badań toksykologiczno-biochemicznych podczas narażenia DON-em. Najwyższe stężenie DON-u stwierdzano w ścianie jelita czczego dopiero w 3. i 4. tygodniu narażenia.

Analizując uzyskane CF ZEN w tkankach przewodu pokarmowego można sugerować, że zależą od topografii ERs. ERs są nierównomiernie rozłożone pomiędzy różnymi tkankami: ERα stwierdza się przede wszystkim w kościach, w gruczole mlekowym, w układzie moczowo-płciowym, w tkankach układu sercowo-naczyniowego i w ośrodkowym układzie nerwowym, z kolei ERβ występuje w przewodzie pokarmowym. Dowodziłoby to, że punktowa kumulacja ZEN w tkankach przewodu pokarmowego jest skorelowana ze stopniem ekspresji Erβ oraz ich nierównomiernych topograficznych skupień (większe wartości w dwunastnicy, jelicie czczym i okrężnicy zstępujacej).

Szczegółowe wyniki i ich omówienie przedstawiono w pracy nr 4.

4.3.4. Podsumowanie

Narażenie niedojrzałych płciowo loszek ZEN w dawce 40 µg/kg masy ciała przez okres 42 dni skutkowało najwyższymi wartości stopnia przeniesienia w pierwszych terminach narażenia w dwunastnicy i jelicie czczym. W końcowych trzech terminach narażenia stwierdzono bardzo wysokie wartości CF w dwunastnicy i okrężnicy zstępującej. Czynnikiem decydującym o wzroście wartości stopnia przeniesienia podczas narażenia ZEN, w wartościach nie wywołujących objawów klinicznych w określonym czasie i w wybranych fragmentach jelit, może być topografia i stopień ekspresji ERβ.

Zwierzęta dziko żyjące są narażone na obecność mikotoksyn fuzaryjnych w surowcach roślinnych na przestrzeni całego roku - jednak w okresie jesienno-zimowym stężenie tych mikotoksyn jest najwyższe. Ma to wpływ na funkcjonowanie układu rozrodczego samic dzika.

Narażenie świń na niskie dawki DON daje inny obraz zmian profilu metabolicznego niż opisane dotychczas przypadki podczas intoksykacji wyższymi dawkami. Obserwowana jest w pierwszym okresie narażenia reakcja organizmu na czynnik toksyczny, który to stan jest następnie niwelowany przez uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych.

4.3.5. Wnioski

Obecność niskich wartości stężeń mikotoksyn w materiale paszowym, tak dla zwierząt domowych (niedojrzałych płciowo loszek) jak i zwierząt dzikich (samice dzika) pozwala na sformułowanie następujących wniosków:

- w ocenie zmian powodowanych obecnością mikotoksyn fuzaryjnych w materiałach paszowych należy brać pod uwagę nie tylko stężenie mikotoksyn, ale również czas działania ze względu na możliwość wyczerpania się zdolności adaptacyjnych zwierząt;
- podczas naturalnego narażania mikotoksynami zwierząt dzikich ma miejsce zależność między wartością stężeń tych mikotoksyn w materiale roślinnym a homeostazą układu rozrodczego;
- niskie stężenia ZEN w materiale roślinnym mogą działać pobudzająco na procesy proliferacyjne zachodzące w jajniku samic dzika.

Piśmiennictwo

1. Akbari P., Braber S., Gremmels H., Koelink P.J., Verheijden K.A., Garssen J., Fink-Gremmels J.: Deoxynivalenol: a trigger for intestinal integrity breakdown. FASEB JOURNAL, 28 (6), 2014, 2414-2429.

2. Alassane-Kpembi I., Puel O., Oswald I. P.: Toxicological interactions between the mycotoxins deoxynivalenol, nivalenol and their acetylated derivatives in intestinal epithelial cells. ARCH TOXICOL, 89 (8), 2015, 1337-1346.

3. Cheli F., Giromini C., Baldi A.: Mycotoxin mechanisms of action and health impact: 'in vitro' or 'in vivo' tests, that is the question. WORLD MYCOTOXIN J, 8 (5), 2015, 573-589.

4. da Rocha M.E.B., Freire F.C.O., Maia F.E.F., Guedes M.I.F., Rondina D.: Mycotoxins and their effects on human and animal health. FOOD CONTROL, 36 (1), 2014, 159-165.

5. Gajęcka M., Rybarczyk L., Zwierzchowski W., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K., Gajęcki M.: The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. Theriogenology, 75, 2011, 1085–1094.

6. Gajecki M.: Zearalenone--undesirable substances in feed. POL J VET SCI, 5 (2), 2002, 117-132.

7. Jakimiuk E., Rybarczyk L., Zwierzchowski W., Obremski K., Gajęcka M., Zielonka Ł., Gajęcki M.: Effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on selected morphometric parameters of the reproductive tract in sexually immature gilts. Bull. Vet. Inst. Pulawy, 54, 2010, 25-28.

8. Keuling O., Stier N., Roth M.: Annual and seasonal space use of different age classes of female wild boar Sus scrofa L. Eur J Wildl Res, 54, 2008, 403-412.

9. Keuling O., Stier N., Roth M.: Commuting, shifting or remaining? Different spatial utilisation patterns of wild boar Sus scrofa L. in forest and field crops during summer. Mamm Biol, 74, 2009, 145-152.

10. Maresca M.: From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. Toxins, 5 (4), 2013, 784-820.

11. Marin S., Ramos A.J., Cano-Sancho G., Sanchis V.: Mycotoxins: Occurrence, toxicology, and exposure assessment. FOOD CHEM TOXICOL, 60, 2013, 218-237.

12. Metzler M., Pfeiffer E., Hildebrand A. A.: Zearalenone and its metabolites as endocrine disrupting chemicals. WORLD MYCOTOXIN J, 3 (4), 2010, 385-401.

13. Murugesan G.R., Ledoux D.R., Naehrer K., Berthiller F., Applegate T.J., Grenier B., Phillips T.D., Schatzmayr G.: Prevalence and effects of mycotoxins on poultry health and performance, and recent development in mycotoxin counteracting strategies. Poult Sci, 94 (6), 2015, 1298-1315.

14. Obremski K., Gajęcki M., Zwierzchowski W., Bakuła T., Apoznański J., Wojciechowski J.: The level of zearalenone and a-zearalenol in the blood of gilts with clinical symptoms of toxicosis, fed diets with a low zearalenone content. J ANIM FEED SCI, 12 (3), 2003, 529-538.

15. Pestka J.J., Zhou H.R., Moon Y., Chung Y.J.: Conference: Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. Toxicol Lett, 153 (1), 2004, 61-73.

16. Pestka J.J.; Smolinski A.T.: Deoxynivalenol: Toxicology and potential effects on humans. J TOXICOL ENV HEAL B. 8 (1), 2005, 39-69.

17. Pestka J.J.: Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. ANIM FEED SCI TECH, 137 (3-4), 2007, 283-298.

18. Pestka J.J.: Deoxynivalenol: mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. ARCH TOXICOL, 84 (9), 2010, 663-679.

19. Pinton P.,, Nougayrède J.P., Del Rio J.C., Moreno C., Marin D.E., Ferrier L., Bracarense A.P., Kolf-Clauw M., Oswald I.P.: The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. TOXICOL APPL PHARM, 237 (1), 2009, 41-48.

20. Piotrowska M., Śliżewska K., Nowak A., Zielonka Ł., Żakowska Z., Gajęcka M., Gajęcki M.: The effect of experimental Fusarium mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents. Toxins, 6, 2014, 2064-2081.

21. Przybylska-Gornowicz B., Tarasiuk M., Lewczuk B., Prusik M., Ziółkowska N., Zielonka Ł., Gajęcki M., Gajęcka M.: The Effects of Low Doses of Two Fusarium Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum. A Light and Electron Microscopic Study. Toxins, 7, 2015, 4684-4705.

22. Rodrigues I., Naehrer K.,: A Three-Year Survey on the Worldwide Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs and Feed. Toxins, 4 (9), 2012, 663-675.

23. Schatzmayr G.; Streit E.: Global occurrence of mycotoxins in the food and feed chain: facts and figures. WORLD MYCOTOXIN J, 6 (3), 2013, 213-222.

24. Speijers G.J.A., Speijers M.H.M.: Combined toxic effects of mycotoxins. TOXICOL LETT, 153, 2004, 91–98.

25. Streit E., Schatzmayr G., Tassis P., Tzika E., Marin D.,Taranu I., Tabuc C., Nicolau A., Aprodu J., Puel O.,Oswald I.P.: Current Situation of Mycotoxin Contamination and Co-occurrence in Animal Feed-Focus on Europe. Toxins, 4 (10), 2012, 788-809.

26. Takemura H., Shim J.Y., Sayama K., Tsubura A., Zhu B.T., Shimoi K.: Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. J Steroid Biochem Mol Biol, 103 (2), 2007, 170-177.

27. Vandenberg L.N., Colborn T., Hayes T.B., Heindel J.J., Jacobs D.R., Lee D-H, Shioda T., Soto A.M., vom Saal F.S., Welshons W.V., Zoeller R.T., Myers .JP.: Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses. Endocr Rev 33, 2012, 378-455.

28. Wu Q.H., Wang X., Yang W., Nüssler A.K., Xiong L.Y., Kuča K., Dohnal V., Zhang X.J., Yuan Z.H.: Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: an update. Arch Toxicol, 88 (7), 2014, 1309-1326.

29. Zinedine A., Soriano J.M., Molto J.C., Manes J.: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. FOOD CHEM TOXICOL, 45 (1), 2007, 1-18.

Łukasz Zielanie