

# **AUTOREFERAT**

**Dr n. wet. Magdalena Monika Gajęcka**

Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie,  
Wydział Medycyny Weterynaryjnej,  
Katedra Epizootiologii

Olsztyn, 2013

## **Autoreferat**

### **1. Imię i nazwisko**

Magdalena Monika Gajęcka

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

**2006** stopień naukowy: doktor nauk weterynaryjnych, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, tytuł rozprawy doktorskiej: *Wpływ eksperymentalnej mikotoksykozy zearalenonowej na układ rozrodczy suk.* Praca została wyróżniona

**2005** dyplom ukończenia podyplomowych studiów specjalizacyjnych z zakresu *Prewencji weterynaryjnej i higieny pasz*, Komisja do Spraw Specjalizacji Lekarzy Weterynarii, Puławy;

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

**2003** dyplom ukończenia studiów podyplomowych z zakresu *Integracji europejskiej i współpracy transgranicznej* na Wydziale Zarządzania, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie;

**2001** tytuł: lekarz weterynarii, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie.

### **3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/artystycznych**

**01.10.2001 – 31.09.2006** Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, doktorantka;

**01.10.2006 – 31.12.2007** Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Katedra Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, asystent;

**01.01.2008 – 30.09.2012** Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, adiunkt;

**01.10.2012 – do chwili obecnej** Katedra Epizootiologii, 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 u suk jako wynik krótkoterminowej mikotoksykozy zearalenonowej”**

Tworzy jedno-tematyczny cykl następujących publikacji:

**4.2. publikacje oryginalne:**

1. **Gajęcka M.\***, Woźny M., Brzuzan P., Zielonka Ł., Gajęcki M. (2011) Expression of CYPsc and 3β-HSD mRNA in bitches ovary after long-term exposure to zearalenone. Bull. Vet. Inst. Pulawy 55, 777-780. (punkty [MNiSW<sub>2011-2012</sub>](#) = 20, [IF](#) = 0,414)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowaniu koncepcji badań i zaplanowanie eksperymentu, wykonanie doświadczeń na zwierzętach (intoksykacja zearalenonem, badanie kliniczne), pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 70%.*

2. **Gajęcka M.\***, Zielonka Ł., Jakimiuk E., Dąbrowski M., Obremski K., Gorlo G., Mróz M., Gajęcki M. (2012) Znaczenie diagnostyczne wybranych wyników laboratoryjnych mikotoksykozy zearalenonowej zwierząt. Med. Wet. 68(9), 566-570. (punkty [MNiSW<sub>2012</sub>](#) = 10, [IF](#) = 0,203)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowaniu koncepcji badań i zaplanowanie eksperymentu, wykonanie doświadczeń na zwierzętach (intoksykacja zearalenonem, badanie kliniczne), pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 60%.*

3. **Gajęcka M.** (2012) The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. Pol. J. Vet. Sci. 15(4), 685-691. (punkty [MNiSW<sub>2012</sub>](#) = 20, [IF](#) = 0,570)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowaniu koncepcji badań i zaplanowanie eksperymentu, wykonanie doświadczeń na zwierzętach (intoksykacja zearalenonem, badanie kliniczne), pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

4. **Gajęcka M.\***, Przybylska-Gornowicz B. (2012) The low doses effect of experimental zearalenone (ZEN) intoxication on the presence of Ca<sup>2+</sup> in selected ovarian cells from pre-pubertal bitches. Pol. J. Vet. Sci. 15(4), 711-720. (punkty [MNiSW<sub>2012</sub>](#) = 20, [IF](#) = 0,570)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie doświadczenia, wykonanie doświadczeń na zwierzętach, pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja*

uzyskanych wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.

5. **Gajęcka M. (2013)** The effect of experimental low zearalenone intoxication on ovarian follicles in pre-pubertal bitches. Pol. J. Vet. Sci. 16(1), 45-54. (punkty **MNiSW<sub>2012</sub> = 20, IF<sub>2012</sub> = 0,570**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowaniu koncepcji badań i zaplanowanie eksperymentu, wykonanie doświadczeń na zwierzętach (intoksykacja zearalenonem, badanie kliniczne), pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

6. **Gajęcka M.\*, Otrocka-Domagala I. (2013)** Immunocytochemical expression of 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in bitch ovaries exposed to low doses of zearalenone. Pol. J. Vet. Sci. 16(1), 55-62. (punkty **MNiSW<sub>2012</sub> = 20, IF<sub>2012</sub> = 0,570**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie doświadczenia, wykonanie doświadczeń na zwierzętach, pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

7. **Gajęcka M. (2013)** The effects of experimental administration of low doses of zearalenone on the histology of ovaries in pre pubertal bitches. Pol. J. Vet. Sci. 16(2), 313-322. (punkty **MNiSW<sub>2012</sub> = 20, IF<sub>2012</sub> = 0,570**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowaniu koncepcji badań i zaplanowanie eksperymentu, wykonanie doświadczeń na zwierzętach (intoksykacja zearalenonem, badanie kliniczne), pobieranie próbek, wykonanie części analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 100%.*

8. **Gajęcka M.\*, Zielonka Ł., Dąbrowski M., Mróz M., Gajęcki M. (2013)** The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17 $\beta$ -estradiol concentrations in blood of pre-pubertal female Beagle dogs. Toxicon 76, 260-269. (punkty **MNiSW<sub>2012</sub> = 30, IF = 2,924**)

*Mój wkład w powstanie tej pracy polegał na – opracowanie koncepcji badań, zaplanowanie doświadczenia, wykonanie doświadczeń na zwierzętach, wykonanie analiz laboratoryjnych, analiza statystyczna i interpretacja uzyskanych wyników, napisanie wstępnej wersji manuskryptu. Mój udział procentowy szacuję na 80%.*

\* - autor korespondencyjny

**Łączna punktacja 8 prac wchodzących w skład jedno-tematycznego cyklu publikacji, zgodnie z rokiem opublikowania, wynosi:**

- wg listy czasopism punktowanych **MNiSW – 160 pkt.**

- łączny współczynnik oddziaływania (**IF**) – **6,635**

Badania finansowane były z projektu badawczego własnego (N N308 242635) „*Obraz zmian w wybranych tkankach suk jako wynik krótkoterminowej, mikotoksykozy zearalenonowej*” przyznanego przez MNiSW (w latach 2008-2011), kierownik dr n. wet. Magdalena Gajęcka.

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

#### **4.3.1. Wprowadzenie**

Wtórne metabolity, jakimi są mikotoksyny mogą powodować stany zatrucia u zwierząt nawet po pobraniu bardzo małych dawek. Najczęściej spotykanymi, mikotoksynami w środowisku są metabolity produkowane przez grzyby pleśniowe z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* czy *Claviceps*.

Z punktu widzenia zdrowia zwierząt i naszej wiedzy wynika, że tylko kilka mikotoksyn ma szczególne znaczenie, ponieważ występują dość często w paszach i wywołują z różnym nasileniem stany zatrucia u zwierząt (Rodrigues i Naehrer, 2012). Odnośnie częstotliwości ich występowania w materiale roślinnym, to należy potwierdzić sugestie niektórych badaczy, że zależy ona od stosowanego sprzętu laboratoryjnego podczas badań pasz i materiałów paszowych na obecność mikotoksyn (Shephard i wsp., 2012) oraz wykorzystywania metodyk uwalniających ich od substancji maskujących (De Saeger i Van Egmond, 2012).

Wśród mikotoksyn fuzaryjnych zearalenon (ZEN) zajmuje szczególną pozycję, ponieważ jest wytwarzany podczas rozwoju roślin uprawnych, ale przed żniwami, ponieważ jego występowania nie można całkowicie uniknąć a jedynie zminimalizować z racji na znaczny wpływ warunków środowiskowych. Z pośród zbóż najbardziej wrażliwa jest pszenica, pszenżyto i kukurydza na infestację grzybami pleśniowymi z rodziny *Fusarium*.

ZEN jest laktonem kwasu rezorcynowego chemicznie opisanym jako 6-(10-hydroksy-6-okso-E-1-undecenylo)- $\beta$ -lakton kwasu rezorcynowego (C<sub>18</sub>H<sub>22</sub>O<sub>5</sub>, Masa Molowa: 318.36 g/mol, CAS – Chemical Abstracts Service – 17924-92-4). Mikotoksyna jest koloru białego, struktury krystalicznej i temperaturę topnienia ma w przedziale 164-165°C, jest nierozpuszczalna w wodzie, lecz rozpuszcza się w środowisku alkalicznym i innych rozpuszczalnikach organicznych. ZEN jest stabilny podczas przechowywania, mielenia, przetwarzania i gotowania oraz jest termostabilny.

ZEN i jego metabolity ( $\alpha$ -zearalenol –  $\alpha$ -ZEL i  $\beta$ -zearalenol –  $\beta$ -ZEL) mają strukturę estrogeno-podobne, ale w przeciwieństwie do steroidów nie wywodzą się ze struktur steranu. Przedstawione toksyny konkurują w organizmie suk z endogennymi estrogenami o miejsca wiązania receptorów estrogenowych (ERs), co prowadzi do zmian w procesie syntezy mRNA i protein powodując zmniejszenie efektywności skutków endogennych czynników estrogenowych. Klinicznie wyraża się to hiperestrogenizmem i/lub zaburzeniami w rozrodzie. Ma to miejsce szczególnie u niedojrzałych płciowo suk. Z wcześniejszych obserwacji własnych (Gajęcka i wsp., 2004) wynika, że objawy hiperestrogenizmu mają miejsce w momencie istotnego wzrostu stężenia ZEN w karmach suchych industrialnych.

Wstępne badania wykazały występujące często, zróżnicowane zawartości ZEN w komercyjnych karmach (Boermans i Leong, 2007; Pietsch i wsp., 2013), przy czym w niektórych przypadkach sięgały one wysokich koncentracji. Obecność tej mikotoksyny stwierdzano w 42 na 45 badanych próbek karm dla psów, w stężeniu od 5,0 do 299,5  $\mu$ g/kg karmy (Zwierzchowski i wsp., 2004). Znaczenie obecności ZEN w karmach pogłębia fakt, iż u suk jest praktykowana monodieta przez wiele miesięcy. Suki są zwierzętami szczególnie wrażliwymi na działanie substancji estrogeno-podobnych. Podwyższone stężenie estrogenów endogennych i egzogennych jest także uznawane za przyczynę wielu innych zaburzeń ustrojowych. Dlatego też długotrwałe pobieranie karm zawierających ZEN może być

czynnikiem powodującym zaburzenia hormonalnej regulacji procesów rozrodczych oraz dysfunkcji jajników (Hatoya i wsp., 2009). Narządem szczególnie wrażliwym na oddziaływanie substancji o właściwościach estrogenowych jest jajnik, w którym łatwo dochodzi do powstawania trwałych zmian (Włodarczyk i wsp., 2009).

Nasza wiedza na temat zależności między endogennymi związkami steroidowymi (progesteron – P<sub>4</sub> i 17β-estradiol – E<sub>2</sub>) a ERs u zwierząt została wykorzystana do oceny wpływu ZEN i jego metabolitów na czynność jajników i wyjaśnienia zmian stwierdzanych podczas histologicznych i immunohistochemicznych analiz jajników u niedojrzałych płciowo suk, którym podawano różne dawki ZEN (50 i 75 μg/kg mc) przez okres 42 dni.

#### **4.3.2. Materiały i metody**

Czynności związane z wykonywaniem doświadczeń na zwierzętach przeprowadzono z zachowaniem obowiązujących w Polsce norm prawnych, które określają warunki i sposoby dokonywania eksperymentów na zwierzętach (Nr opinii Lokalnej Komisji Etycznej do Spraw Doświadczeń na Zwierzętach – 37/2006 z dnia 24 października 2006 roku).

Materiałem badawczym było 30 klinicznie zdrowych, niedojrzałych płciowo suk, genetycznie homogennej rasy Beagle, w wieku około 70 dni i masie ciała około 8 kg w momencie rozpoczęcia doświadczenia. Zwierzęta podzielono na 3 grupy po 10 zwierząt: doświadczalna I (EI) (n=10) – podawano 50 μg (100% NOAEL – maksymalny poziom substancji, przy którym nie obserwuje się jeszcze działań ubocznych - Boermans i Leung, 2007) - ZEN/kg mc *per os*, raz dziennie; doświadczalnej II (EII) (n=10) – podawano, 75 μg (150 % NOAEL) ZEN/kg mc *per os*, raz dziennie; oraz grupa kontrolna (C) (n=10) – podawano *per os* placebo nie zawierające ZEN. ZEN podawano przez 42 dni. Na zakończenie doświadczenia, czyli w około 112 dniu życia suk, wszystkie zwierzęta zostały poddane owariektomii. W uzyskanych próbkach jajników wykonano następujące badania laboratoryjne: histologiczne (Gajęcka, 2013b); ultrastrukturalne (Gajęcka, 2013a); ultralokalizację Ca<sup>2+</sup> (Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012); immunohistochemiczne typu TUNEL i test PCNA (Gajęcka 2013a); immunocytochemiczną ocenę ekspresji dehydrogenaz hydroksysteroidowych (HSDs) (Gajęcka i Otrocka-Domagala, 2013), ekspresję mRNA CYPsc i 3β-HSD (Gajęcka i wsp., 2011b) oraz ERs (Gajęcka, 2012). W pobranej krwi, co tydzień, oznaczano koncentrację ZEN i dwóch jego metabolitów oraz P<sub>4</sub> i E<sub>2</sub> (Gajęcka i wsp., 2013).

#### **4.3.3. Omówienie wyników**

##### **4.3.3.1. Miejsce ZEN w środowisku**

Biorąc pod uwagę wszechobecność estrogenów środowiskowych należy uświadomić sobie, że mogą one wpływać nie tylko na organizmy dziko żyjące, ale również na zwierzęta gospodarskie i towarzyszące oraz ludzi w sposób niekontrolowany. Zgodnie z sugestiami Anser Ahmed (2000) estrogeny obecne są nie tylko, jako składniki naturalnie występujące w organizmie, ale mogą być to również estrogeny środowiskowe, jak ksenobiotyki lub pochodzenia naturalnego. Te współcześnie znane substancje (niekiedy zanieczyszczenia) nazywane estrogenami środowiskowymi, w większości wchodzi w skład grupy związków określanych jako EDs (endocrine disrupters), które powszechnie spotykane są w środowisku, ziemi, powietrzu, wodzie i w środkach spożywczych czy karmach (Yurino i wsp., 2004; Crain i wsp., 2008). Z kolei naturalnymi EDs występującymi w środowisku są to, fitoestrogeny (np. genisteina, kumestrol) i mikoestrogeny (mikotoksyny – np. ZEN), czyli produkty grzybów pleśniowych (Gajęcki i wsp., 2010).

ZEN zaliczany do mikoestrogenów, szczególnie silnie oddziałuje na jajniki, które są jednym z głównych narządów produkujących estrogeny (Alm i wsp., 2006; Fink-Gremmels i Malekinejad, 2007). Biologiczne efekty wywołane w jajniku stanowią jedną z metod oceny działania tych substancji (Scippo i wsp., 2002). Ponadto patologiczne stany jajników są u suk bardzo istotnym elementem zaburzeń ich zdrowia. W etiopatogenezie stanów chorobowych jajników, istotną rolę odgrywają dysfunkcje hormonalne, polegające między innymi na wzmożonym oddziaływaniu estrogenów (Whitehead i Rice, 2006). W przedstawionych badaniach niedojrzałych płciowo suk rasy Beagle będących pod wpływem ZEN i jego metabolitów wykazano istnienie wielu zaawansowanych zmian wstecznych (metamorphoses regresiva) takich jak przekrwienie, zwyrodnienie oraz zanik komórek i tkanek. Dotyczyły one prawie wszystkich struktur jajników (Gajęcka, 2012; 2013a; 2013b; Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012; Gajęcka i Otrocka-Domagała, 2013). Podobne obserwacje stwierdzano podczas badań własnych dotyczące działań ZEN u suk wieloródek (Gajęcka i wsp., 2008a, 2008b), albo fitoestrogenów, co dokumentowali inni autorzy (McClain i wsp., 2005).

#### **4.3.3.2. Histopatologia jajników**

Powierzchnia zewnętrzna jajników u suk pokryta jest nabłonkiem powierzchniowym jajnika (OSE), który ma różne zadania fizjologiczne do spełnienia. Po pierwsze, jest częściową barierą dla procesów bioaktywnej dyfuzji między zrębem i OSE. Po drugie jest czynnikiem decydującym o okresowym uwalnianiu dojrzałych lub dojrzewających pęcherzyków jajnikowych. W grupach E, obraz histologiczny OSE wskazywał na obecności tych komórek w innych strukturach jajnika. W grupie EI stwierdzano niewielkie wpuklenia sięgające błony białawej. W grupie EII przedstawione zjawisko wyrażone było dużo bardziej zdecydowanie, ponieważ te wpuklenia dochodziły do części zewnętrznej kory. Można przypuszczać, że obecność wspomnianych wpukleń jest wynikiem obecności ZEN i  $\alpha$ -ZEL w organizmie sucek, natomiast wielkość i częstotliwość tych wpukleń jest wprost proporcjonalne do podawanych wartości ZEN wraz z karmą. Należałoby mieć również na uwadze sugestie niektórych badaczy (Auersperg i wsp., 2001), że tego rodzaju wpuklenia mają miejsce u suk wieloródek, jako wynik poowulacyjnej proliferacji, czego trudno oczekiwać u suk dojrzewających. W efekcie, przedstawione zmiany u badanych zwierząt można byłoby sugerować, że są zmianami patologicznymi.

W efekcie stany histopatologiczne OSE i części korowej jajnika mogą być prowokowane faktem silniejszego przekrwienia części korowej jajnika w obu grupach E spowodowane zwiększeniem liczby naczyń włosowatych i/lub rozszerzeniem światła tychże naczyń krwionośnych (wazodylatacja). Obie sytuacje powodują spadek ciśnienia krwi, ponieważ rośnie ogólna objętość układu krwionośnego przy stałej jej objętości. Ma miejsce łatwiejszy dostęp ZEN i  $\alpha$ -ZEL do komórek estrogeno-zależnych w jajniku w wyniku spowolnieniem przepływu krwi przez wszystkie tkanki jajników. Czyli komórkami, w których są obecne białka ER (Auersperg i wsp., 2001).

Wracając do badań histologicznych należałoby zwrócić uwagę na rozmieszczenie pęcherzyków pierwotnych (primordial) i pierwszorzędowych (primary), które z zasady były w zewnętrznej części korowej, a ich udział w tkankach jajnika wskazywał na tendencję spadkową w obu grupach E w porównaniu z grupą C. Tendencja ta była silniej wyrażona w grupie EII, czyli była proporcjonalna do wielkości dawki miktotoksyny w karmie. Przedstawioną tendencję po części można tłumaczyć faktem wpuklenia się OSE w błonie białawej a nawet w warstwy powierzchniowe części korowej (grupa EII), czyli zrębu (stroma), co może powodować ich miejscowe rozrzedzenie. Przedstawiony stan, fizjologicznie ma

miejsce u dojrzałych płciowo suczek (tuż przed owulacją) i jest przyczynkiem do wystąpienia fizjologicznej apoptozy (Auersperg i wsp., 2001). U zwierząt młodych dojrzewających (jaki uczestniczyły w doświadczeniu) jest to jednak stan patologiczny, ponieważ pęcherzyki pierwotne powstają dopiero między 17 a 54 dniem życia suki (Songsasen i wsp., 2009). Przez kolejne 120 dni stwierdza się dodatkowo obecność pęcherzyków pierwszorzędowych a eksperyment prowadzony był między 70 a 112 dniem życia suk.

Kolejnym stanem histologicznym stwierdzanym u badanych suczek, była tendencja zwiększającego się udziału atrezyjnych pęcherzyków jajnikowych w obu grupach E w stosunku do grupy C, która była wprost proporcjonalna do wielkości dawki ZEN w karmie. Pęcherzyki te z zasady były umiejscowione w części rdzennej kory jajnika. W związku z tym, można przypuszczać, że proces atrezji pęcherzyków jajnikowych nie był „spontaniczny” (z racji, że suczki były bardzo młode), lecz wymuszony wobec większych pęcherzyków (Doležel i wsp., 2004). Za takim tokiem myślenia przemawia fakt, że proces intoksykacji trwał aż 42 dni a my dysponowaliśmy obrazem tylko z ostatniego dnia eksperymentu.

W większych pęcherzykach proces atrezji zaczynał się od ściany pęcherzyka, czyli od zewnątrz w wyniku inwazji tkanki łącznej do ich wnętrza. W trakcie tego procesu komórki osłonki pęcherzyka upodabniają się do komórek paraluteinowych i stają się elementami strukturalnymi gruczołu śródmiąższowego jajnika stając się dodatkowym źródłem estrogenów (Akihara i wsp., 2007). Potwierdzeniem tego są wyniki u tych samych suk (Gajęcka, 2013) które dokumentują statystycznie ( $P < 0,05$  i  $< 0,01$ ) wzrost koncentracji  $E_2$  odpowiednio w obu grupach E, którym towarzyszył statystyczny ( $P < 0,05$ ) spadek koncentracji  $P_4$  tylko w grupie EII w stosunku do grupy C.

#### **4.3.3.3. ERs w jajnikach**

U samic w wieku rozrodczym  $ER\beta$  jest dominującym ER (Chu i wsp., 2004; Juengel i wsp., 2006; Koehler i wsp., 2005; Słomczyńska, 2002; Taylor i Al-Azzawi, 2000; Vaskivuo i wsp., 2005; Wąsowicz i wsp., 2011). Występowanie  $ER\beta$  u świń i suk wykazano na każdym etapie rozwoju pęcherzyka jajnikowego, od pęcherzyka pierwotnego do pęcherzyka owulacyjnego, oraz w każdej fazie rozwoju ciała żółtego, natomiast obecność  $ER\alpha$  stwierdzano jedynie w dużych, przedowulacyjnych pęcherzykach oraz we wczesnym stadium rozwoju ciała żółtego (Hiroi i wsp., 1999; Słomczyńska, 2002). W badaniach wykonanych przez Hatoya i wsp. (2009) nie stwierdzono obecności  $ER\alpha$  w oocytach i komórkach wzgórcza jajonośnego podczas dojrzewania komórek jajowych w jajowodach suk, czemu towarzyszyło jednak zwiększenie koncentracji  $E_2$ . To tłumaczyłoby, dlaczego u badanych suk nie stwierdzono obecności receptorów typu  $ER\alpha$  w żadnej z komórek jajnika dojrzewającego (Gajęcka, 2012).

ZEN ma większe powinowactwo do  $ER\alpha$  niż do  $ER\beta$  będąc równocześnie mocnym agonistą tego ostatniego (Mueller i wsp. 2004). Aktywność ZEN względem  $ER\beta$  ma charakter mieszany w zależności od stopnia jego koncentracji oraz fazy cyklu estralnego (Hatoya i wsp., 2009). Zestawienie wyników badań Korach i wsp. (2003) odnośnie lokalizacji rodzajów ER w jajniku u różnych gatunków zwierząt oraz wyników badań własnych (Gajęcka, 2012) odnośnie ich rozmieszczenia w jajniku wskazują, że zmiany obserwowane w obrębie omawianej tkanki układu rozrodczego są następstwem oddziaływania ZEN i  $\alpha$ -ZEL poprzez  $ER\beta$ . Równocześnie należałoby mieć na uwadze fakt, że w miarę wzrostu dawki ZEN w karmie spada udział  $ER\beta$  w tkankach jajnika (Gajęcka, 2012). Przedstawiona sytuacja upoważnia do postawienia pewnej sugestii typu, że występujące przekrwienia w części korowej jajnika może być wynikiem pozagenomowego działania estrogenów (Bishop i



Stormshak, 2008). Jednym z tego rodzaju estrogenów ZEN jest postrzegany, jako egzogeny ligand prowokujący zwiększenie stężenia  $E_2$  (lecz tylko w końcowym etapie doświadczenia) (Gajęcka i wsp., 2013; Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012), co prowadziło do ostrego rozszerzania się naczyń krwionośnych (wazodylatacja). Jest to sytuacja przeciwstawna do sugestii Barton (2012), który twierdzi, że procesowi wazodylatacji musi dodatkowo towarzyszyć koekspresja ERs w formie funkcjonalnego przesłuchu (cross-talk).

Z kolei fakt przytłumienia koncentracji  $E_2$  u suk grupy C zostało prawdopodobnie spowodowane obecnością jedynie receptorów typu  $ER\beta$  w jajnikach (Gajęcka, 2012; Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012). Może to mieć miejsce, ponieważ ERs w formie monomerów mają zdolność do wpływania na ekspresję genów w sposób konstytutywny bez udziału wspomnianego hormonu. Szczególnie odnosi się to do  $ER\beta$ , ponieważ receptor ten ma zdolność łączenia się bezpośrednio z miejscem wybiórczo wrażliwym w ERE (estrogen response element – elementy odpowiedzi estrogenowej) na DNA (Liu i wsp., 2008) co byłoby bardzo ważne dla rozwoju organizmu, jako takiego. Czyli rozwój komórek jajnika może mieć miejsce mimo bardzo niskiej fizjologicznej koncentracji  $E_2$ . Natomiast dodatkowa obecność w organizmie ZEN powoduje spadek udziału tych  $ER\beta$ , jako efekt redundancji funkcjonalnej spowodowanej nadmiarem substancji estrogeno-podobnych różnego pochodzenia.

ERs wpływają również na mechanizmy modyfikacji epigenetycznej (Taylor i wsp., 2010) czyli modyfikują aktywności genów w jądrze komórkowym, pozwalając na „cofnięcie” komórki do wcześniejszego etapu rozwoju. W przypadku ERs polega to na wyhamowaniu procesów ich ekspresji przez promotorów, jakimi są odwracalna metylacja i acetylacja histonów (Leader i wsp., 2006). Da Silva Faria i wsp. (2008) udokumentował, że nawet u żeńskiego potomstwa szczurzym, niedożywionych białkowo i energetycznie, stwierdzano zmiany morfologiczne typu „cofnięcia” w jajnikach, wzrost koncentracji  $E_2$  w surowicy krwi oraz zmniejszenie ekspresji mRNA jajnikowych receptorów typu  $ER\alpha$ ,  $ER\beta 1$  i  $ER\beta 2$ .

Z racji, że ZEN jest egzogenym pozagenomowym ligandem (Barton, 2012), łącząc się z ERs zmienia jego konformację, zmieniając przyłączany koaktywator i aktywując go jako agonistę lub częściowo jako agonistę i antagonistę. Równowaga agonistyczno-antagonistyczna zależy głównie od podtypu ER, badanej tkanki i względnego poziomu ligandów lub receptorów (McDonnell i wsp., 2002). W związku z tym nasuwa się spostrzeżenie typu – że ZEN w tym konkretnym przypadku łącząc się z  $ER\beta$  spowodował jego konformację aktywując go prawdopodobnie jako antagonistę, co spowodowało w grupie EI nieznaczny a w grupie EII istotny spadek obecności  $ER\beta$  w jajnikach suk niedojrzałych płciowo w porównaniu do grupy C jako przykład modyfikacji epigenetycznej.

#### **4.3.3.4. Badania immunohistochemiczne**

Zgodnie z sugestiami Auersperg i wsp. (2001), narażenie zrębu jest przyczynkiem do indukcji procesu apoptozy. Potwierdzeniem tego, są badania własne (Gajęcka, 2013a), podczas których określano indeks proliferacyjny (PI) i apoptotyczny (AI) pęcherzyków jajnikowych tych samych suk. Stwierdzono spowolnienia procesów proliferacyjnych a wzmożenia procesów apoptozy w pęcherzykach pierwotnych i pierwszorzędowych w obu oocytach jak i w komórkach pęcherzykowych. Ponadto z innych badań własnych (Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012) wynika, że śmierć komórki może mieć miejsce w wyniku redundancji funkcjonalnej  $Ca^{2+}$  w mitochondriach prowokując dysfunkcje mitochondriów i związanego z tym spadku lub nawet utraty aktywności metabolicznej mitochondriów w oocytach, komórkach pęcherzykowych i śródmiąższowych u suk dojrzewających.

I tak w obu grupach E obserwowano słabiej wyrażony PI badanych pęcherzyków jajnikowych. Dowodem na to, jest wartość ogólna mediany PI, która wyniosła 25,49. Również wartości mediany PI dla poszczególnych grup (EI=22,79; EII=18,20; C=35,49), dokumentują fakt, że w wyniku trwającej mikotoksykozy zearalenonowej procesy proliferacyjne uległy silnemu spowolnieniu w oocytach pęcherzyków pierwotnych i wzrastających w porównaniu do grupy C. W pęcherzykach atrezyjnych tego rodzaju różnic w aktywności proliferacyjnej nie stwierdzano. Należałoby również wziąć pod uwagę fakt, że spadek PI następuje z reguły pod wpływem estrogenów (Van Cruchten i wsp., 2004). W przedstawionym badaniu okres intoksykacji był dość długi, zaś opisane zmiany proliferacyjne są charakterystyczne dla mającej miejsce estrogenowej redundancji funkcjonalnej (De Bosschere i wsp., 2002). Wzmożenie procesów proliferacyjnych było natomiast wyraźnie widoczne u suk grupy C, czemu towarzyszył obraz prawidłowo zachowanych struktur jajnika. Jądrowa ekspresja białka PCNA u tych zwierząt wskazuje na fizjologiczną proliferację, związaną z prawidłową sekrecją estrogenów (na bardzo niskim poziomie – zjawisko hormezy) uwalnianych z pęcherzyków (Songsasen i Wildt 2007).

W badaniach własnych (Gajęcka, 2013a) na tych samych zwierzętach, mediana AI dla całej grupy 30 suk wyniosła 13. Z kolei w odniesieniu do poszczególnych grup eksperymentu stwierdzano dużo wyższą medianę AI w grupie EI (13,45) i dwukrotnie wyższą w grupie EII (17,84) w porównaniu z grupą C (8,59) lub z ogólną medianą. Wartości te są wysokie, jeśli je porównamy do wyników uzyskiwanych w niedojrzałych oocytach u bydła wynoszące 7 (Matwee i wsp., 2000). Inaczej to wygląda w odniesieniu do oocytów zwierząt dojrzałych gdzie mediany dochodzą do 23. Przy czym należy pamiętać, że wartości te wzrastają wraz z wiekiem samicy (Matwee i wsp., 2000), a przecież w przedstawionym eksperymencie (Gajęcka, 2013a) badano jajniki suk dojrzewających, co sugeruje, że fizjologicznie AI powinien być niewielki.

#### **4.3.3.5. Badania ultrastrukturalne jajników**

Bardzo pomocne stały się wyniki badań ultrastrukturalnych (Gajęcka, 2013a; Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012) na przykład w grupie EI, podczas których stwierdzano procesy degeneracji w oocytach oraz komórkach pęcherzykowych komórek pierwotnych i rozwijających. Bardziej sugestywny obraz dezintegracji komórek obserwowano w grupie EII gdzie zmiany atrezyjne stwierdzano w ogólnym widoku pęcherzyków pierwotnych i wzrastających a w szczególności w oocytach i w komórkach pęcherzykowych tych pęcherzyków oraz w komórkach wnękowych. Oocyty w większości przypadków uległy całkowitemu rozpadowi. W komórkach pęcherzykowych stwierdzano zanik połączeń międzykomórkowych, wakuolizację przestrzeni międzykomórkowych oraz zanik podstawowych organelli w cytoplazmie. A co najważniejsze obserwowano niewyraźny obrys i zupełne zatarcie struktury wewnętrznej mitochondriów. Organelli odpowiedzialnej za odtwarzanie i utrzymanie na stałym poziomie odpowiednich zasobów energii, czyli ATP, którego niedobór jest przyczynkiem do zainicjowania apoptozy (Moreira i wsp., 2011).

Wiadomo, że przez cały okres wzrostu i dojrzewania, oocyty pozostają w ścisłym związku z komórkami pęcherzykowymi za pośrednictwem tzw. złączy szczelinowych. Czynnikiem osłabiającym połączenia komórek mógł być ZEN, ponieważ zanik połączeń międzykomórkowych i powiększanie się przestrzeni międzykomórkowych stwierdzano po części w grupie EI a bardzo silnie wyrażone były w grupie EII. W pęcherzykach jajnikowych zwykle występuje pewna liczba pęcherzyków ze zmianami apoptotycznymi, przy czym sygnał apoptotyczny przekazywany jest z komórek pęcherzykowych do oocytu dopiero po

przekroczeniu pewnego krytycznego poziomu ich aktywności np. spadku poziomu ATP w wyniku destrukcji mitochondriów (Moreira i wsp., 2011).

Z kolejnych badań tych samych suzek (Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012) wynika, że proces apoptozy uruchamiany w komórkach jajnika podczas mikotoksykozy zearalenonowej u tych suk był typu wewnątrzkomórkowego i rozpoczynał się w mitochondriach. Z racji, że obecność ZEN i/lub jego metabolitu  $\alpha$ -ZEL wywołuje stan hyperestrogenizmu (redundancję funkcjonalną), co powodowało wzrost ilości  $\text{Ca}^{2+}$  w mitochondriach. Sugeruje to, że ma miejsce, stymulowany  $\text{E}_2$  i ZEN wzrost stężenia komórkowego  $\text{Ca}^{2+}$ , co aktywuje mitochondrialną fosfatazę białkową, która defosforyluje oksydazę cytochromu c. Aktywne białko przyczynia się z kolei do wzrostu błonowego potencjału mitochondrialnego powodując w mitochondriach zwiększenie stężenia  $\text{Ca}^{2+}$ . Mechanizm wzrostu poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  nie jest do końca poznany (Gellerich i wsp., 2010). Wzrost stężenia  $\text{Ca}^{2+}$  w mitochondriach promuje z kolei tworzenie reaktywnych form tlenu (Felty i Roy, 2005), co w konsekwencji dalszej jest czynnikiem inicjującym apoptozę (Mortira i wsp., 2011). Mając na uwadze właściwości  $\text{E}_2$  (Barton, 2012) i podwyższenie jego koncentracji (Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012) można założyć, że w grupie EII to obecność ZEN w karmie spowodowała wystąpienie estrogenowej redundancji funkcjonalnej co stało się przyczynkiem obecność dużych złogów  $\text{Ca}^{2+}$  rozproszonych w mitochondriach, w gruzie komórkowym lub w pozostałościach oocytu.

Globalne stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  w cytosolu musiało być znacznie wyższe niż normalnie, chociaż nie zawsze np. w grupie EI. Przedstawiona sytuacja w grupie EII była prawdopodobnie kolejnym czynnikiem uszkodzającym komórki w prezentowanym doświadczeniu. W takiej sytuacji mitochondria prawdopodobnie otoczyły obszar, w którym wzrosło stężenie  $\text{Ca}^{2+}$  by pobierając jony wapnia stworzyć barierę uniemożliwiającą rozlanie się sygnału wapniowego w całej komórce (Gunter i Sheu, 2009). Niestety substancja niepożądana, jaką jest ZEN miała silniejsze działanie defragmentujące a może nawet destrukcyjne wobec oocytu czy komórek ziarnistych w obu grupach eksperymentalnych. Równocześnie stwierdzono, że przedstawionej sytuacji towarzyszył wzrost koncentracji  $\text{Ca}^{2+}$  w macierzy mitochondrium (Gajęcka i Przybylska, 2012), co mogło być wynikiem, uniportowej koncentracji, ale również brakiem możliwości odpływu z racji trwającego eksperymentalnego hyperestrogenizmu spowodowanego redundancją funkcjonalną ZEN u bardzo młodych i niedojrzałych płciowo organizmów suzek z grup E. Fizjologiczna koncentracja  $\text{Ca}^{2+}$  w macierzy mitochondrialnej powinna się również zmieniać odpowiednio do zmian poziomu  $\text{Ca}^{2+}$  w cytozolu.

#### **4.3.3.6. Biotransformacja $\text{P}_4$ i $\text{E}_2$**

##### **4.3.3.6.1. ZEN jako modulator HSDs**

Estrogeny są czynnikiem decydującym o normalnym rozwoju żeńskiego układu rozrodczego (Taylor i wsp., 2010). Z racji tej należałoby również zwrócić uwagę na fakt, że ZEN jest czynnikiem zaburzającym funkcje endokryne (EDs). Mikoestrogeny a w tym i ZEN z reguły działają wielokierunkowo (Roselli i wsp., 2000; Wąsowicz i wsp., 2011). Między innymi mogą one modulować aktywność enzymów biorących udział w procesie biosyntezy estrogenów, takich jak aromatazy, sulfatazy, sulfotransferazy czy nadrodzinę HSDs jak np  $3\beta$ -HSD i  $17\beta$ -HSD na poziomie prereceptorowym (Tiemann i wsp., 2003; Wuttke i wsp., 2002). Te ostatnie katalizują przebieg reakcji nie tylko w różnych etapach biosyntezy  $\text{P}_4$  czy  $\text{E}_2$ , lecz także przekształcają aktywność receptorów keto-steroidowych w

formę mniej aktywną, co stanowi o jednym ze sposobów regulacji aktywności hormonalnej na poziomie prereceptorowym (Penning, 2003; Tiemann i wsp., 2003).

Wcześniejsze rozważania o  $\text{Ca}^{2+}$  należy uznać za prawdziwe z racji tej, że koncentracja  $\text{Ca}^{2+}$  jest podwyższana w mitochondriach w celu regulacji aktywności dehydrogenaz hydroksysteroidowych (HSDs) w macierzy mitochondrialnej, nieodzownych w homeostazie  $\text{P}_4$  i  $\text{E}_2$  na poziomie prereceptorowym. Przy czym stwierdzono, że ZEN spełnia również rolę substancji macierzystej dla tych enzymów (Penning, 2003; Gajęcka i wsp., 2009; Gellerich i wsp., 2010; Gajęcka i Otrocka-Domagała, 2013). HSDs, a szczególnie  $3\beta$ - i  $17\beta$ -HSD, są między innymi swego rodzaju przełącznikami molekularnymi dopuszczającymi do modulacji prereceptorów hormonów sterydowych w retikulum endoplazmatycznym eukariontów (Marchais-Oberwinkler i wsp., 2011) lub w organizmach prokariotycznych (Kisiela i wsp., 2012). U eukariontów w przypadku  $3\beta$ -HSD odbywa się to np. w odniesieniu do  $\text{P}_4$  a  $17\beta$ -HSD w odniesieniu do  $\text{E}_2$ . Z kolei substratem wobec  $3\beta$ -HSD jest pregnenolon a wobec  $17\beta$ -HSD może być estrion. Wiadomo, że na aktywność HSDs mają wpływ również inne substancje typu ksenoestrogeny, fitoestrogeny oraz leki.

Z racji, że w przedstawionym doświadczeniu zwierzęta były intoksykowane ZEN przez 42 dni należałoby wziąć pod uwagę fakt, że w sytuacji zbyt niskiej aktywności enzymów I fazy detoksykacji (gdzie cytochromy P450 biorą czynny udział w I fazie detoksykacji oraz w tzw. aktywności antyportowej na poziomie, enterocyty - Boermans i Leung, 2007; Gajęcka i wsp., 2009) w odniesieniu do ilości pobranego ZEN ma miejsce zachwianie równowagi procesu detoksykacji pomiędzy I a II fazą i następuje przenikanie do organizmu metabolitów typu  $\alpha$ -ZEL (od 1 do 2 ng/ $\mu\text{l}$  – Gajęcka i wsp., 2013) i  $\beta$ -ZEL (0 ng/ $\mu\text{l}$  – Gajęcka i wsp., 2013), co potwierdzają sugestie innych toksykologów (Plewka, 2011). Metabolity te mogą powodować znaczne zmiany aktywności enzymów biorących udział w procesie sterydogenezy lub regulacji hormonalnej na poziomie przedreceptorowym zależnie od dawki substratu (ZEN i jego metabolitów – przy tych ostatnich efekt jest odwrotnieproporcjonalny). Tego rodzaju aktywność ZEN potwierdzają badania Busk i wsp. (2012).

Wzrost wartości dawki ZEN (grupa EII) powodował efekt odwrotny, ponieważ stwierdzano statystycznie istotny spadek gęstości optycznej badanych enzymów (HSDs) we wszystkich badanych komórkach w porównaniu z grupą EI. Są to jednak wartości nie zawsze mniejsze od wartości stwierdzanych w grupie C a szczególnie na poziomie +++ w przypadku  $17\beta$ -HSD oraz w przypadku  $3\beta$ -HSD tylko w pęcherzykach trzeciorzędowych. Spadek wartości gęstości optycznej w grupie EII w porównaniu z grupą EI prawdopodobnie spowodowany został wystąpieniem zjawiska określanym, jako hormeza polegającym na tym, że wiele substancji toksycznych a w tym i substancje niepożądane (np. ZEN) w koncentracji poniżej wartości NOAEL (wartości progowej) działają na organizm stymulująco/adaptująco a powyżej mogą być przyczynkiem występowania zjawiska określanego, jako hamowanie (inhibicja – spowodowane przekroczeniem dawki progowej) (Heberer i wsp., 2007; Dobrzański i Fornalski, 2011). Z naszych badań wynika (Gajęcka i wsp., 2013), że obecność ZEN w karmach industrialnych dla psów w dawkach bardzo małych (w okolicach wartości NOAEL) nie powoduje wystąpienia objawów klinicznych intoksykacji, może być jednak przyczynkiem do wzmożenia somatycznych procesów proliferacyjnych, których intensywność jest odwrotnie proporcjonalna do wielkości dawki ZEN.

Procesy dezaktywujące lub spadku aktywności  $17\beta$ -HSDs polega między innymi na wpływie substratów pochodzenia zewnętrznego, które działają, jako ligandy niesteroidowe

lub sterydy, a będąc silnym elektrofilem mogą łączyć się z grupą alkilową prowadząc do nieodwracalnego wyhamowania aktywności enzymów (Penning, 2011). Ponadto aktywność estrogenów jest regulowana poziomem ERs w wyniku ich ekspresji oraz stopniem modulacji w retikulum endoplazmatycznym wynikającym z wzajemnej konwersji między hormonami (np.  $E_2$ ) a ich nieczynnymi odpowiednikami ( $E_1$  i siarczan estronu).  $17\beta$ -HSDs w obu szlakach mają nadrzędne znaczenie ponieważ katalizują aktywację  $E_1$  do  $E_2$  oraz inaktywują  $E_2$  do  $E_1$  i są kluczowymi enzymami aktywowanymi podczas rozwoju, wzrostu i funkcjonowania tkanek układu rozrodczego (Huhtinen i wsp., 2012). Enzymy te, są obecne w zależności od ekspresji związków tkankowo zależnych dla enzymów estrogenowych. Zróżnicowana ekspresja tych enzymatycznych regulatorów prereceptorowych może prowadzić do podwyższonej koncentracji  $E_2$  (Motohara i wsp., 2010). Potwierdzają to badania własne (Gajęcka i Przybylska-Gornowicz, 2012) podczas których stwierdzono podwyższenie koncentracji  $E_2$  w ostatnim dniu doświadczenia, brak ER $\alpha$  oraz spadek udziału ER $\beta$  w jajnikach odwrotnie proporcjonalnie do dawki ZEN (Gajęcka, 2012). Zaistniała sytuacja wpływa na mechanizmy modyfikacji epigenetycznej (Taylor i wsp., 2010). Procesu polegającego na modyfikacji aktywności genów w jądrze komórkowym, pozwalającym na „cofnięcie” komórki do wcześniejszego etapu rozwoju.

#### **4.3.3.6.2. Ekspresja mRNA dla genu $3\beta$ -HSD i CPSsc**

Wyniki badań własnych (Gajęcka i wsp., 2011a; 2011b) dowodzą, że u loszek jak i u niedojrzałych suk przy dawce NOAEL (np. grupa EI) nie stwierdzono statystycznego wzrostu poziomu mRNA dla genu  $3\beta$ -HSD i CPSsc w odniesieniu do grupy C, czyli organizmy sobie radziły bez żadnych perturbacji z tą nieznaczną intoksykacją ZEN (swego rodzaju tolerancji wobec mikotoksykozy). W grupie EII, w której podawano wyższe wartości ZEN (150% wartości NOAEL) sukum, stwierdzono jednak statystycznie istotny ( $P = 0,016$ ) wzrost poziomu mRNA, lecz tylko, dla  $3\beta$ -HSD, co jest bardzo istotne dla podtrzymania procesów sterydogenezy a nie dla jej wywołania oraz/lub jako wynik nagromadzenia substratu, jakim jest ZEN (Gajęcka i wsp., 2009). Zaistniała sytuacja może być prowokowana również faktem, że u młodych suk koncentracja  $P_4$  jest z zasady bardzo niska, co nie sprzyja biotransformacji ZEN do  $\alpha$ -ZEL (Tiemann i wsp., 2003). Towarzyszył temu siedmiokrotny wzrost liczby transkryptów mRNA, ale tylko dla  $3\beta$ -HSD przy równoczesnym dwukrotnym, lecz statystycznie nieistotnym wzroście poziomu mRNA dla genu CYPsc na granicy istotności statystycznej ( $P = 0,076$ ) (Gajęcka i wsp., 2011b), co w konsekwencji dalszej powoduje spadek aktywności (aktywności optycznej) tego enzymu w komórkach ziarnistych.

Przy niższej dawce ZEN (grupa EI) ma miejsce zwiększenie gęstości optycznej (w %)  $3\beta$ - i  $17\beta$ -HSD w porównaniu do grupy C we wszystkich etapach rozwoju komórek pęcherzykowych. W przypadku  $3\beta$ -HSD spowodowane to jest prawdopodobnie zaburzeniami stopnia ekspresji mRNA  $3\beta$ -HSD, które decydują o procesach syntezy  $P_4$  oraz z racji niższego poziomu ekspresji mRNA CYPsc (pierwszy czynnik szacująco-ograniczający dla procesu sterydogenezy), co powoduje spadek koncentracji pregnenolonu. Jedną z form kontroli sekrecji, to regulacja poziomu ekspresji genów kodujących enzymy sterydogenne, których ekspresja i aktywność zależy od poziomu substratu, którym może być ZEN (Malekinejad i wsp., 2006).

#### **4.3.3.6.3. Koncentracja ZEN i jego metabolitów oraz $P_4$ i $E_2$ we krwi obwodowej**

Towarzyszyło temu bardzo odmienne wartości koncentracji  $P_4$  i  $E_2$ . W EI koncentracja  $P_4$  była niska i porównywalna z grupą C, co jest zgodne z wynikami prac innych autorów (Gobello i wsp., 2001), czyli w sytuacji, gdy dawka jest stymulująca lub mieści się w

granicach tolerancji pokarmowej, procesy fizjologiczne w układzie rozrodczym suk przebiegały normalnie. Większą koncentrację  $P_4$  stwierdzano w grupie EII gdzie odnotowano wartości statystycznie istotne ( $P < 0.01$ ) dwu- lub trzykrotnie wyższe w porównaniu z grupą C i EI (Gajęcka i wsp., 2013). Szczególnie w 2, 3 i 4 terminie pobierania próbek krwi. Terminy te są kompatybilne z terminami o najwyższych wartościach udziału  $\alpha$ -ZEL w ZON (ZEN +  $\alpha$ -ZEL +  $\beta$ -ZEL). Zaistniała sytuacja może być prowokowana również faktem, że u młodych suk fizjologicznie koncentracja  $P_4$  jest z zasady bardzo niska, co nie sprzyja biotransformacji ZEN do  $\alpha$ -ZEL (Gajęcka i wsp., 2013; Tiemann i wsp. 2003). Z badań własnych (Gajęcka i wsp., 2011b) wynika, że sytuacji tej towarzyszył siedmiokrotny wzrost liczby transkryptów *mRNA*, ale tylko dla  $3\beta$ -HSD, co prawdopodobnie w konsekwencji dalszej powodowało jednak zwiększenie koncentracji  $P_4$ .

Można uznać, że ZEA,  $\alpha$ -ZEL i  $\beta$ -ZEL są potencjonalnymi substancjami powodującymi zaburzenia endokrynologiczne w wyniku inicjowania nadmiernego uwalniania hormonów sterydowych ( $P_4$  i  $E_2$ ). Uzyskane wyniki potwierdzają sugestie przedstawione również przez Dunber i wsp. (2012) oraz Frizell i wsp. (2011). Narażenie (exposure) niskimi dawkami ZEN (w obu grupach E) spowodowało wzrost produkcji hormonów sterydowych a szczególnie  $P_4$  w początkowej fazie doświadczenia. Inaczej przebiegał proces w odniesieniu do  $E_2$ , ponieważ zwiększenie jego koncentracji w obu grupach E w porównaniu do grupy C nastąpiło w dwóch końcowych terminach badań (Gajęcka i wsp., 2013). W efekcie nastąpiła zmiana fizjologicznej kolejności wzrostu koncentracji wspomnianych hormonów (wbrew hipotezie Van Cruchten i wsp., 2004) w okresie dojrzewania (inaczej mówiąc przed pierwszą rują), co może prowadzić do fałszywych objawów behawioralnych (fałszywa ruja), dojrzałości płciowej lub zmian histologicznych w tkankach estrogenozależnych (np. wpuklenia OSE).

#### 4.3.4. Podsumowanie

W piśmiennictwie brak jest prac dotyczących łącznej oceny wpływu wszystkich analizowanych w obecnym materiale wskaźników podczas długoterminowej intoksykacji ZEN niedojrzałych płciowo suk. Dostępne jest natomiast dość bogate piśmiennictwo dotyczące znaczenia każdego z tych wskaźników rozpatrywanych oddzielnie, lecz nie podczas intoksykacji ZEN i u innych gatunków zwierząt, najczęściej laboratoryjnych.

U badanych suk:

- Podczas badań histologicznych stwierdzono: patologiczne wpuklenia OSE i wynikających z tego konsekwencji morfologicznych oraz zaniku pęcherzyków jajnikowych, którym towarzyszyły liczne wycieknięcia krwi i obecność naczyń krwionośnych z rozszerzonym światłem;
- W badaniach mikroskopowych obraz ultrastrukturalny jajnika dostarczył istotnych informacji o tym, że: oocyty w większości przypadków uległy częściowemu lub całkowitemu rozpadowi; w komórkach pęcherzykowych stwierdzano zanik połączeń międzykomórkowych; miała miejsce wakuolizacja przestrzeni międzykomórkowych oraz zanik podstawowych organelli w cytoplazmie; a co najważniejsze obserwowano niewyraźny obrys lub/i zupełne zatarcie struktury wewnętrznej mitochondriów;
- Podczas badań immunohistochemicznych: stwierdzono w tkankach jajnika: brak obecności ER $\alpha$  oraz znaczący spadek udziału, jedynie obecnych ER $\beta$ ; stwierdzono spowolnienia procesów proliferacyjnych a wzmocnienia procesów apoptozy w pęcherzykach pierwotnych i pierwszorzędowych w obu oocytach jak i w komórkach

pęcherzykowych jajnika; stwierdzono zbyt dużego nagromadzenia  $Ca^{2+}$  w mitochondriach, ich dysfunkcji i w efekcie, spadek czy nawet utratę aktywności metabolicznej mitochondriów w oocytach, komórkach pęcherzykowych i w komórkach wnąkowych jajników eksperymentalnych, co stało się przyczynkiem wzmożenia procesów apoptozy; stwierdzono obecność enzymów  $3\beta$ -HSD i  $17\beta$ -HSD oraz zmiany stopnia ich gęstości optycznej, co sugeruje, że zmiany aktywności wspomnianych enzymów na poziomie przed receptorowym zależą od dawki substratu, jakim był ZEN i zmiany te są odwrotnie proporcjonalne;

- Przedstawione zmiany lub sytuacje w grupie EI (intoksykacji < wartości NOAEL) wskazywały na wyzwolenie procesów adaptacji i/lub tolerancji pokarmowej wyrażających się np.: wzrostem aktywności HSDs, wielkością wartości mediany PI i AI które były zbliżone do wartości w grupie C czy obecnością zmian sugerujących wystąpienie modyfikacji genetycznej;
- Podczas długoterminowej monotonicznej intoksykacji ZEN niedojrzałych płciowo suk, można sugerować, że: (i) procesy biotransformacji ZEN do  $\alpha$ -ZEL i  $\beta$ -ZEL miały miejsce we wszystkich grupach przez cały okres doświadczenia a największy % udział  $\alpha$ -ZEL miał miejsce w grupie EII w ostatnich pięciu terminach badań; (ii) wysokość koncentracji ZEN i  $\alpha$ -ZEL w krwi obwodowej miały istotny wpływ na nie fizjologiczną koncentrację  $P_4$  i  $E_2$  we wszystkich terminach badań w obu grupach E; (iii) w rezultacie procesy proliferacji zostały wyhamowane w piątym tygodniu zatrucia, co uwidocznilo się znacznym spadkiem przyrostu masy ciała u niedojrzałych płciowo suk;
- Na podstawie przeprowadzonych badań endokrynologicznych w ostatnim dniu eksperymentu stwierdzono, że: stan eksperymentalnego hyperestrogenizmu wywołany estrogenową redundancją funkcjonalną, powodował zaburzenia endokryne wyrażające się zwiększoną koncentracją  $E_2$ , (co pogłębiało hyperestrogenizm) i spadkiem koncentracji  $P_4$  w grupie EII;
- W grupie EII (150% wartości NOAEL – > wartości progowej) udokumentowano zmiany wsteczne, jednoznacznie wskazujące na wzmożenie procesów destrukcji tkankowej i/lub organelli komórkowych oraz zaburzenia endokryne wyrażające się np.: zmianami patologicznymi w OSE, części korowej jajnika czy pęcherzyków jajnikowych; zbyt dużym nagromadzeniem się  $Ca^{2+}$  w mitochondriach oraz zanikiem lub rozpadem ich struktur; znaczącym spadkiem udziału ER $\beta$ ; spadkiem wartości mediany PI a wzrostem mediany AI w tkankach jajnika; oraz wzrostem stężenia  $E_2$  i spadkiem stężenia  $P_4$  w krwi obwodowej doprowadzając do estrogenowej redundancji funkcjonalnej;
- Z punktu widzenia diagnostycznego należy się liczyć, że niskie dawki ZEN są przyczyną zmian fizjologicznej kolejności wzrostu koncentracji  $P_4$  i  $E_2$  w okresie dojrzewania (inaczej mówiąc przed pierwszą rują), co może prowadzić do fałszywych objawów behawioralnych (fałszywa ruja), fałszywej dojrzałości płciowej lub zmian histologicznych w tkankach estrogenozależnych, co w konsekwencji dalszej może powodować opóźnienie lub brak możliwości prokreacji dojrzewających lub dojrzałych suk.

#### 4.3.5. Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań laboratoryjnych jajników oraz krwi niedojrzałych płciowo suk rasy Beagle, intoksykowanych niskimi dawkami ZEN przez okres 42 dni, nasuwają się następujące wnioski:

- Hyperestrogenizm wywołany został estrogenową redundancją funkcjonalną w wyniku obecności w organizmie ZEN i  $\alpha$ -ZEL oraz wzrostem koncentracji endogennego E<sub>2</sub>;
- Niskie dawki ZEN poniżej wartości NOAEL może mieć stymulująco/tolerancyjny efekty między 5-tym a 6-tym tygodniem intoksykacji, natomiast dawki powyżej wartości NOAEL sugerują, że nawet bardzo niskie dawki ZEN mogą działać, jako EDs wpływające na stężenie P<sub>4</sub> i E<sub>2</sub> we krwi, który początkowo stymuluje, ale ostatecznie spowalnia tempo przyrostu masy ciała u niedojrzałych płciowo suk;
- Dawka ZEN poniżej wartości NOAEL powodowała: zmiany ultramikroskopowe, histologiczne, immunohistochemiczne jajników i endokrynologiczne krwi obwodowej wskazujące na, wystąpienie procesów adaptacyjno-tolerancyjnych prowokujących wystąpienie modyfikacji epigenetycznej;
- Dawka ZEN powyżej wartości progowej NOAEL powodowała: zmiany ultramikroskopowe, histologiczne, immunohistochemiczne jajników i endokrynologiczne krwi obwodowej wskazujące na nieodwracalne procesy patologiczne tak na poziomie komórek jak i tkanek jajników;
- Zgodnie z prawem hormezy dawki poniżej wartości NOAEL działają stymulująco na intoksykowane organizmy, czyli należałoby sugerować, że podczas likwidacji ZEN w materiałach roślinnych powinniśmy proces ten prowadzić tylko do wartości poniżej wartości NOAEL a nie dążyć do całkowitego jego wyeliminowania.

#### Piśmiennictwo

- Akihara, Y.; Shimoyama, Y.; Kawasako, K.; Komine, M.; Hirayama, K.; Terasawa, A.; Ohmachi, T.; Matsuda, K.; Okamoto, M.; Taniyama, H. Histological and immunohistochemical evaluation of canine ovary. *Reprod. Dom. Anim.* **2007**, *42*, 495-501.
- Alm, H.; Brüssow, K.P.; Torner, H.; Vanselow, J.; Tomek, W.; Dänicke, S.; Tiemann, U. Influence of Fusarium-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reprod. Toxicol.* **2006**, *22*, 44-50.
- Ansar Ahmed, S. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology* **2000**, *150*, 191-206.
- Auersperg, N.; Wong, A.S.T.; Choi, K.-C.; Kang, S.K. Ovarian surface epithelium: biology, endocrinology, and pathology. *Endocr. Rev.* **2001**, *22*, 255-288.
- Barton, M. Position paper: The membrane estrogen receptor GPER – Clues and questions. *Steroids* **2012**, *77*, 935-942.
- Bishop, C.V.; Stormshak, F. Non-genomic actions of progesterone and estrogens in regulating reproductive events in domestic animals. *Vet. J.* **2008**, *176*, 270-280.
- Boermans, H.J.; Leung, M.C. Mycotoxins and the pet food industry: toxicological evidence and risk assessment. *Int. J. Food Microbiol.* **2007**, *119*, 95-102.
- Busk, Ø.L.; Frizzell, C.; Verhaegen, S.; Uhlig, S.; Connolly, L.; Ropstad, E.; Sørlie, M. Cytosol protein regulation in H295R steroidogenesis model induced by the zearalenone metabolites,  $\alpha$ - and  $\beta$ -zearalenol. *Toxicol.* **2012**, *59*, 17-24.
- Chu, S.; Nishi, Y.; Yanase, T.; Nawata, H.; Fuller, P.J. Transrepression of estrogen receptor  $\beta$  signaling by nuclear factor- $\kappa$ B in ovarian granulosa cells. *Mol. Endocrinol.* **2004**, *18*, 1919-1928.
- Crain, D.A.; Janssen, S.J.; Edwards, T.M.; Heindel, J.; Ho, S.; Hunt, P.; Iguchi, T.; Juul, A.; McLachlan, J.A.; Schwartz, J.; Skakkebaek, N.; Soto, A.M.; Swan, S.; Walker, C.; Woodruff, T.K.; Woodruff, T.J.; Giudice, L.C.; Guillette, L.J. Female reproductive disorders: the roles of endocrine disrupting compounds and developmental timing. *Fertil. Steril.* **2008**, *90*, 911-940.
- da Silva Faria, T.; de Bittencourt Brasil, F.; Sampaio, F.J.B.; da Fonte Ramos, C. Maternal malnutrition during lactation alters the folliculogenesis and gonadotropins and estrogen isoforms ovarian receptors in the offspring at puberty. *J. Endocrinol.* **2008**, *198*, 625-634.
- De Bosschere, H.; Ducatelle, R.; Tshamala, M.; Coryn, M. Changes in sex hormone receptors during administration of progesterone to prevent estrus in the bitch. *Theriogenology* **2002**, *58*, 1209-1217.
- De Saeger, S.; van Egmond, H.P. Special issue: masked mycotoxins. *World Mycotoxin J.* **2012**, *5*, 203-206.
- Dobrzyński, L.; Fornalski, K.W. Hormesis - Natural phenomenon of answer of organism on stress. Proceeding, VII International Scientific Conference: *Veterinary Feed Hygiene – The Effects of Mycotoxins on Gastrointestinal Function*. 23-24 September 2011, Olsztyn, Poland, **2011**, pp. 6-14.
- Doležel, R.; Kyliánková, R.; Kummer, V.; Mašková, J.; Stará, P.; Vitásek, R. Follicular population and oestrogen receptor alpha in ovary of the bitch. *Acta Vet. Brno* **2004**, *73*, 37-43.



- Dunbar, B.; Patel, M.; Fahey, J.; Wira, C. Endocrine control of mucosal immunity in the female reproductive tract: Impact of environmental disruptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *354*, 85-93.
- Felty, Q.; Roy, D. Estrogen, mitochondria and growth of cancer and non-cancer cells. *J. Carcinog.* **2005**, *4*, 1-9.
- Fink-Gremmels, J.; Malekinejad, H. Clinical effects and biochemical mechanisms associated with exposure to the mycoestrogen zearalenone. *Anim. Feed Sci. Tech.* **2007**, *137*, 326-341.
- Frizzell, C.; Ndossi, D.; Verhaegen, S.; Dahl, E.; Eriksen, G.; Sfrlie, M.; Ropstad, E.; Muller, M.; Elliott, C.T.; Connolly, L. Endocrine disrupting effects of zearalenone, alpha- and beta-zearalenol at the level of nuclear receptor binding and steroidogenesis. *Toxicol. Letters* **2011**, *206*, 210-217.
- Gajęcka, M. The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoeexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* **2012**, *15*, 685-691.
- Gajęcka, M. The effect of experimental low zearalenone intoxication on ovarian follicles in pre-pubertal bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* **2013a**, *16*, 45-54.
- Gajęcka, M. The effects of experimental administration of low doses of zearalenone on the histology of ovaries in pre pubertal bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* **2013b**, *16*, 313-322.
- Gajęcka M.; Otrocka-Domagala I. Immunocytochemical expression of 3 $\beta$ - and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase in bitch ovaries exposed to low doses of zearalenone. *Pol. J. Vet. Sci.* **2013**, *16*, 55-62.
- Gajęcka, M.; Przybylska-Gornowicz, B. The low doses effect of experimental zearalenone (ZEN) intoxication on the presence of Ca<sup>2+</sup> in selected ovarian cells from pre-pubertal bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* **2012**, *15*, 711-720.
- Gajęcka, M.; Jakimiuk, E.; Polak, M.; Otrocka-Domagala, I.; Janowski, T.; Zwierzchowski, W.; Obremski, K.; Zielonka, L.; Apoznański, J.; Gajęcki, M. Zearalenone applied *per os* provides adverse effects in structure of chosen parts of bitch reproductive system. *Pol. J. Vet. Sci.* **2004**, *7*, 59-66.
- Gajęcka, M.; Jakimiuk, E.; Zielonka, L.; Obremski, K.; Gajęcki, M. The biotransformation of chosen mycotoxins. *Pol. J. Vet. Sci.* **2009**, *12*, 293-303.
- Gajęcka, M.; Obremski, K.; Jakimiuk, E.; Skorska-Wyszyńska, E.; Zielonka, L.; Gajęcki, M. Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone micotoxicosis. *Pol. J. Vet. Sci.* **2008a**, *11*, 363-366.
- Gajęcka, M.; Przybylska-Gornowicz, B.; Obremski, K.; Polak, M.; Jakimiuk, E.; Skorska-Wyszyńska, E.; Zielonka, L.; Gajęcki, M. Ultra structural picture of ovary in bitch after experimental zearalenone micotoxicosis. *Pol. J. Vet. Sci.* **2008b**, *11*, 327-337.
- Gajęcka, M.; Rybarczyk, L.; Zwierzchowski, W.; Jakimiuk, E.; Zielonka, L.; Obremski, K.; Gajęcki, M. The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone micotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts. *Theriogenology* **2011a**, *75*, 1085-1094.
- Gajęcka, M.; Woźny, M.; Brzuzan, P.; Zielonka, L.; Gajęcki, M. Expression of CYPsc and 3 $\beta$ -HSD mRNA in bitches ovary after long-term exposure to zearalenone. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* **2011b**, *55*, 777-780.
- Gajęcka, M.; Zielonka, L.; Dąbrowski, M.; Mróz, M.; Gajęcki, M. The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17 $\beta$ -estradiol concentrations in blood of pre-pubertal female Beagle dogs. *Toxicol* <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicol.2013.08.060>
- Gajęcki, M.; Gajęcka, M.; Jakimiuk, E.; Zielonka, L.; Obremski, K. Zearalenone – undesirable substance, in: Rai, M., Varma, A. (Eds.), *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg*, **2010**, pp. 131-144.
- Gellerich, F.N.; Gizatullina, Z.; Trumbeckaite, S.; Nguyen, H.P.; Pallas, T.; Arandarcikaite, O.; Vielhaber, S.; Seppet, E.; Striggow, F. The regulation of OXPPOS by extramitochondrial calcium. *BBA-Bioenergetics* **2010**, *1797*, 1018-1027
- Gobello, C.; de la Sota, R.L.; Goya, R.G. Study of the change of prolactin and progesterone during dopaminergic agonist treatments in pseudopregnant bitches. *Animal Reprod. Sci.* **2001**, *66*, 257-267.
- Gunter, T.E.; Sheu S.-S. Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> transport mechanisms. *BBA-Bioenergetics* **2009**, *1787*, 1291-1308.
- Hatoya, S.; Sugiyama, Y.; Nishida, H.; Okuno, T.; Torii, R.; Sugiura, K.; Kida, K.; Kawate, N.; Tamada, H.; Inaba, T. Canine oocyte maturation in culture: Significance of estrogen and EGF receptor gene expression in cumulus cells. *Theriogenology* **2009**, *71*, 560-567.
- Heberer, T.; Lahrssen-Wiederholt, M.; Schafft, H.; Abraham, K.; Pzyrembel, H.; Henning, K.J.; Schauzu, M.; Braeunig, J.; Goetz, M.; Niemann, L.; Gundert-Remy, U.; Luch, A.; Appel, B.; Banasiak, U.; Böhl, G.F.; Lampen, A.; Wittkowski, R.; Hensel, A. Zero tolerances in food and animal feed-Are there any scientific alternatives? A European point of view on an international controversy. *Toxicol. Letters* **2007**, *175*, 118-135.
- Hiroi, H.; Inoue, S.; Watanabe, T.; Goto, W.; Orimo, A.; Momoeda, M.; Tsutsumi, O.; Taketani, Y.; Muramatsu, M. Differential immunolocalization of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in rat ovary and uterus. *J. Mol. Endocrinol.* **1999**, *22*, 37-44.
- Huhtinen, K.; Stahle, M.; Perheentupa, A.; Poutanen, M. Estrogen biosynthesis and signaling in endometriosis. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2012**, *358*, 146-154.
- Juengel, J.L.; Heath, D.A.; Quirke, L.D.; McNatty, K.P. Oestrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$ , androgen receptor and progesterone receptor mRNA and protein localization within the developing ovary and in small growing follicles of sheep. *Reprod.* **2006**, *131*, 81-92.
- Kisiela, M.; Skarka, A.; Ebert, B.; Maser, E. Hydroxysteroid dehydrogenases (HSDs) in bacteria – A bioinformatic perspective. *J. Steroid. Biochem.* **2012**, *129*, 31-46.
- Koehler, K.F.; Helguero, L.A.; Haldosén, L.A.; Warner, M.; Gustafsson, J.A. Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta. *Endocr. Rev.* **2005**, *26*, 465-478.
- Korach, K.S.; Emmen, J.M.; Walker, V.R.; Hewitt, S.C.; Yates, M.; Hall, J.M.; Swope, D.L.; Harrell, J.C.; Couse, J.F. Update on animal models developed for analyses of estrogen receptor biological activity. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **2003**, *86*, 387-391.
- Leader, J.E.; Wang, C.; Popov, V.M.; Fu, M.; Pestell, R.G. Epigenetics and the estrogen receptor. *Ann. NY Acad. Sci.* **2006**, *1089*, 73-87.
- Liu, Y.; Gao, H.; Marstrand, T.T.; Strom, A.; Valen, E.; Sandelin, A.; Gustafsson, J.-A.; Dahlman-Wright, K. The genome landscape of ER $\alpha$ - and ER $\beta$ -binding DNA regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 2604-2609.
- Malekinejad, H.; Van Tol, H.T.A.; Fink-Gremmels, J. Expression of 3 $\alpha$ - and 3 $\beta$ -hydroxy steroid dehydrogenase mRNA in COCs and granulosa cells determines Zearalenone biotransformation. *Toxicol. in Vitro* **2006**, *20*, 458-463.
- Marchais-Oberwinkler, S.; Henn, C.; Moller, G.; Klein, T.; Negri, M.; Oster, A.; Spadaro, A.; Werth, R.; Wetzel, M.; Xu, K.; Frotscher, M.; Hartmann, R.W.; Adamski, J. 17 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenases (17 $\beta$ -HSDs) as therapeutic targets: Protein structures, functions, and recent progress in inhibitor development. *J. Steroid. Biochem.* **2011**, *125*, 66-82.
- Matwee, C.; Betts, D.H.; King, W.A. Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* **2000**, *8*, 57-68.
- McClain, R.M.; Wolz, E.; Davidovich, A.; Pfannkuch, F.; Lausch, J. Subchronic and chronic safety studies with genistein in dogs. *Food Chem. Toxicol.* **2005**, *43*, 1461-1482.

## Załącznik nr 2 do wniosku o przeprowadzenie postępowania habilitacyjnego

- McDonnell, DP.: Connor, C.E.; Wijayaratne, A.; Chang, C.-Y.; Norris, J.D. Definition of the molecular and cellular mechanisms underlying the tissue-selective agonist/antagonist activities of selective estrogen receptor modulators. *Recent Prog. Horm. Res.* 2002, 57, 295-316.
- Moreira, P.I.; Custódio, J.B.; Nunes, E.; Oliveira, P.J.; Moreno, A.; Seica, R.; Oliveira, C.R.; Santos, M.S. Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 $\beta$ -estradiol and tamoxifen. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 2011, 123, 8-16.
- Motohara, K.; Tashiro, H.; Taura, Y.; Ohba, T.; Katabuchi, H. immunohistochemical analysis of 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase isozymes in human ovarian surface epithelium and epithelial ovarian carcinoma. *Med. Mol. Morphol.* 2010, 43, 197-203.
- Mueller, S.; Simon, S.; Chae, K.; Metzler, M.; Korach, K.S. Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  in human cells. *Toxicol. Sci.* 2004, 80, 14-25.
- Penning, T.M. Hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation of steroid hormone action. *Hum. Reprod. Update* 2003, 9, 193-205.
- Penning, T.M. Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation. *J. Steroid Biochem.* 2011, 125, 46-56.
- Pietsch, C.; Kersten, S.; Burkhardt-Holm, P.; Valenta, H.; Danicke, S. Occurrence of deoxynivalenol and zearalenone in commercial fish feed: An initial study. *Toxins*, 2013, 5, 184-192.
- Plewka, A. The metabolism of xenobiotics in alimentary system with special regard to the role of large intestine. Proceeding, VII International Scientific Conference: *Veterinary Feed Hygiene - The Effects of Mycotoxins on Gastrointestinal Function.* 23-24 September 2011, Olsztyn, Poland, 2011, pp. 60-69.
- Rodrigues, I.; Naehrer, K. A Three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 2012, 4, 663-675.
- Rosselli, M.; Reinhart, K.; Imthurn, B.; Keller, P.J.; Dubey, R.K. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. *Hum. Reprod. Update* 2000, 6, 332-350.
- Shephard, G.S.; Berthiller, F.; Burdaspal, P.A.; Crews, C.; Jonker, M.A.; Krska, R.; MacDonald, S.; Malone, R.J.; Marago, C.; Sabino, M.; Solfrizzo, M.; Van Egmond, H.P.; Whitaker, T.B. Developments in mycotoxin analysis: an update for 2010-2011. *World Mycotoxin J.* 2012, 5, 3-30.
- Scippo, M.L.; Van De Weerd, C.; Willemsen, P.; Francois, J.M.; Rentier-Delrue, F.; Muller, M.; Martial, J.A.; Maghuin-Rogister, G. Detection of illegal growth promoters in biological samples using receptor binding assays. *Anal. Chim. Acta* 2002, 473, 135-141.
- Ślomońska, M. The dynamic of the steroid hormone receptors distribution in the ovary. *Post. Biol. Kom.* 2002, 29, 27-46.
- Songsasen, N.; Fickes, A.; Pukazhenth, B.S.; Wildt, D.E. Follicular morphology, oocyte diameter and localization of fibroblast growth factors in the domestic dog ovary. *Reprod. Dottiest. Anim.* 2009, 44, 65-70.
- Songsasen, N.; Wildt, D.E. Oocyte biology and challenges in developing in vitro maturation systems in the domestic dog. *Anim. Reprod. Sci.* 2007, 98, 2-22.
- Taylor, A.H.; Al-Azzawi, F. Immunolocalisation of estrogen beta in human tissues. *J. Mol. Endocrinol.* 2000, 24, 145-155.
- Taylor, S.E.; Martin-Hirsch, P.L.; Martin F.L. Oestrogen receptor splice variants in the pathogenesis of disease. *Cancer Letters* 2010, 288, 133-148.
- Tiemann, U.; Tomek, W.; Schneider, F.; Vanselow, J. Effects of the micotoxins a- and B-zearalenol on regulation of progesterone synthesis in cultured granulosa cells from porcine ovaries. *Reprod. Toxicol.* 2003, 17, 673-681.
- Van Cruchten, S.; Van den Broeck, W.; D'haeseleer, M.; Simoens, P. Proliferation patterns in the canine endometrium during the estrous cycle. *Theriogenology* 2004, 62, 63 1-641.
- Vaskivuo, T.E.; Maentausta, M.; Torn, S.O.; Oduwole, A.; Lönnberg, R.; Herva, V.; Isomaa, J.S.; Tapanainen, A. Estrogen receptors and estrogen-metabolizing enzymes in human ovaries during fetal development. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2005, 90, 3752-3756.
- Wąsowicz, K.; Chmielewska, M.; Łosiewicz, K. Estrogen receptors - morphology, physiology, pathology. Proceeding, VII International Scientific Conference: *Veterinary Feed Hygiene - The Effects of Mycotoxins on Gastrointestinal Function.* 23-24 September 2011, Olsztyn, Poland, 2011, pp. 56-59.
- Whitehead, S.A.; Rice, S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis. *Best. Pract. Res. Cl. En.* 2006, 20, 45-61.
- Włodarczyk, R.; Bukowska, D.; Jaśkowski, J.M. Oogenesis and ultrastructure of bitch oocytes. *Życie Wet.* 2009, 84, 972-977.
- Wuttke, W.; Jarry, H.; Westphalen, S.; Christoffel, V.; Seidlova-Wuttke, D. Phytoestrogens for hormone replacement therapy? *J. Steroid Biochem.* 2002, 53, 133-147.
- Yurino, I.-I.; Ishikawa, S.; Sato, T.; Akadegawa, K.; Ito, T.; Ueha, S.; Inadera, H.; Matsushima, K. Endocrine disrupters (environmental estrogens) enhance autoantibody production by B1 cells. *Toxicol. Sci.* 2004, 81, 139-147.
- Zwierzchowski, W.; Gajęcka, M.; Obremski, K.; Zielenka, L.; Baranowski, M. The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004, 7, 289-293

Gajęcka Magdalena