

Immunohistochemiczna lokalizacja VEGF w jajnikach loszek żywionych paszą z zearalenonem

TERESA DOBOSZYŃSKA, ANETA ANDRONOWSKA, ANTONI JARCZYK*

Zakład Histofizjologii Rozrodu Instytutu Rozrodu Zwierząt i Badań Żywności PAN, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn

*Katedra Hodowli Trzody Chlewnej Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-718 Olsztyn

Doboszyńska T., Andronowska A., Jarczyk A.

Immunohistochemical location of VEGF in the ovaries of gilts fed a diet containing zearalenone

Summary

The aim of the study was to determine the immunolocalization of VEGF in the ovarian tissues of 60-day-old gilts. The animals were divided into 5 groups (n=3), depending on the level of feed contamination with natural (ZENn) and/or crystal zearalenone (ZENk) and/or no addition of Fix-A-Tox, mycotoxin absorber and Mycofix Plus causing ZEN chemical degradation. The feed of control groups K1 and K2 contained low levels of ZENn, but group K2 had three times higher levels of ZEN than group K1, and no F-A-T agents or Mycofix Plus. Only group K1 had healthy ovarian tissues displaying VEGF immunoreactivity in the endothelium of the capillaries (mainly circumfollicular) and in the endothelium of the ovarian hilus vessels and epithelial layer. In group K2 the high level of ZENk may have been the major cause of follicular cell degradation, which formed aggregate bundles having strong VEGF immunoreactivity. In groups D1, D2 and D3, immunoreactivity in the ovarian tissues differed in particular structures. In group D1 degeneration was observed in all follicles, including primary and various sized secondary follicles. The most intensive VEGF immunoreactions were characterized by the remains of the oocyte nucleus, ovarian epithelium and blood vessels wall of the ovarian hilus. The most intensive changes were observed in ovaries originating from group D2. Despite the addition of F-A-T absorber, the cell bundles were visible in all ovarian cortexes. Only some small fragments displayed positive VEGF immunoreactivity. D3 was the only experimental group in which reconstruction of the ovarian tissues was possible. After using VEGF the immunoreactions revealed that although various elements had degenerated, some of them still retained both the structure of various sized follicles as well as a developing capillary network. In this case it can not be excluded that Mycofix Plus significantly influenced the absorption of mycotoxin, which, depending on its level in the diet can lead to the complete destruction of ovaries in pigs.

Keywords: zearalenone, gilts, ovary – VEGF

Dotychczasowe badania wskazują, że zearalenon (ZEN) jest niesteroidową estrogeną toksyną, produkowaną przez grzyby z rodzaju *Aspergillus* i *Fusarium* w ziarnach różnych zbóż (10, 16, 19, 20), prowadzącą do zaburzeń w układzie rozrodczym. Według przyjętych ustaleń na 53. spotkaniu Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (1) i Opinion of the Scientific Committee on Fusarium Toxins (2), ZEN jest określany na podstawie dawki, która nie wywołuje reakcji hormonalnej u świni – gatunku uznanego za najbardziej wrażliwy. Do najbardziej charakterystycznych objawów zatrucia ZEN należą: powiększenie masy macicy (19) oraz obrzęk i zaczerwienienie sromu (10, 11, 15, 19). Rzadziej występują: wypadanie pochwy i odbytu (19), przedłużająca się ruja lub jej brak, zmiany *libido*, ciąża urojona, niepłodność, powiększenie gruczołu sutkowego i zaburzenia laktacji (8, 11).

U niedojrzałych płciowo loszek, otrzymujących 2 µg ZEN/kg masy ciała, stwierdzono objawy hyperestro-

genizmu, a przy dawce 3 µg ZEN/kg masy ciała – objawy ciąży rzekomej (8). Natomiast prowadzone przez nas badania wskazują, że zearalenon prowadzi do wielu zmian nie tylko w macicy (6), ale także w jajnikach (7). Do szczególnych zmian w macicy należy pogrubienie błony śluzowej i produkcja „mleczka macicznego” przez nabłonek pokrywowy i gruczołowy macicy (6). W przypadku jajników, kora jajnika ulegała silnemu zwłóknieniu, a pęcherzyki rozpadały i sukcesywnemu zanikowi, w tym pojawiające się przejściowo pęcherzyki wielojajowe (7).

W obecnych badaniach podjęto próbę lokalizacji w jajniku świni, czynnika wzrostu naczyniowego śródbłónka – VEGF, nazywanego także czynnikiem naczyniowej przepuszczalności – VPF lub waskulotropiną (9). Czynniki te przyczyniają się do kompleksowej kontroli angiogenezy i waskulogenezy we wczesnym rozwoju zarodka (3, 14) oraz dalszych stadiów rozwoju i życia w różnych tkankach (14, 21, 26). Ponadto, VEGF jest dla śródbłónka potencjalnym morfogenem

i chemoatraktantem oraz może być stymulowany przez niedotlenienie narządów i tkanek, cytokiny i różne hormony (18). Szczególną właściwością jest wytwarzanie VEGF w komórkach zmienionych patologicznych, w tym nowotworów oraz powiązanie z angiogenezą narządów rozrodczych i więzadła szerokiego macicy (4, 5, 12, 17). W jajnikach ekspresja mRNA dla tej cytokiny jest okresowa i związana z rozwojem pęcherzyków i ciałek żółtych, co wskazuje, że VEGF jest mediatorem fizjologicznej angiogenezy (22). Podczas cyklu rujowego u świni, we wzroście ciała żółtego, głównymi komórkami proliferującymi są komórki naczyniowego śródbłonka. Obserwacja ta jest zgodna z wysokim stopniem unaczynienia i przepływu krwi w dojrzałym ciałku żółtym (25). Lutealna ekspresja VEGF występuje najpierw w komórkach przynajmniej (wliczając mięśniówkę gładką tętnic i kapilarne perycyty) i jest regulowana przede wszystkim przez poziom tlenu oraz kontrolowana przez parakryne, endokryne i autokryne regulacje oraz metaboliczne sygnały komórkowe (13, 23, 24).

Celem obecnych badań było określenie immunolokalizacji czynnika wzrostu naczyniowego śródbłonka (VEGF) w jajnikach loszek karmionych paszą skażoną zearalenonem.

Materiał i metody

Do badań użyto tkanek jajników 15 loszek w wieku 40 dni, o wyrównanej masie ciała, pochodzących od loch PIC i po knurach pietrain $\times$ duroc. Okres doświadczeń wynosił 14 dni, a zwierzęta podzielone były na 5 grup ($n = 3$). Zwierzęta żywiono mieszanką ze śruty kukurydzianej (80%) i koncentratu wysokobiałkowego (20%). Do mieszanki dla zwierząt z grup kontrolnych (K_1 i K_2) użyto śrutę kukurydzianą o niskim poziomie zanieczyszczenia ZEN, podczas gdy w grupach doświadczalnych (D_1 , D_2 , D_3) – śrutę o wysokim poziomie skażenia ZEN (tabela 1). Ponadto, w jednej z grup kontrolnych (K_2) i doświadczalnych (D_2) wprowadzono dodatek 200 μ g ZEN krystalicznego na 1 kg paszy (Sigma Aldrich). W celu zapobieżenia wpływom zearalenonu, loszkom z grupy D_2 dodawano do paszy absorber mikotoksyn: Fix-A-TOX (F-A-T, Alvetra und Wernut, Austria), którego związkami czynnymi są naturalne glikokrzemiany, a głównym składnikiem jest klinoptylolit. Innym dodatkiem, wprowadzanym do paszy loszkom z grupy D_3 , był 0,1% Mycofix Plus (Biomin GT1, Austria), w którym wykorzystywane są działania składników mikrobiologicznych oraz absorpcja w celach detoksykacji.

Jajniki każdej loszki pobierano bezpośrednio po uboju i utrwalano w 4% paraformaldehynie na 0,1 M buforze fosforanowym (PB, pH = 7,4) przez 4 godziny. Utrwalone tkanki płukano w PB i przechowywano w 18% roztworze sacharozy. Skrawki kriostatowe (Leica CM 3000) o grubości 12 μ m barwiono immunohistochemicznie z zastosowaniem specyficznych poliklonalnych przeciwciał przeciwko VEGF.

Immunohistochemiczna lokalizacja VEGF. Skrawki tkanek przechowywane w -70°C suszono przez ok. 30 min. w temperaturze pokojowej, płukano w 0,1 M PBS

(pH = 7,4). W celu zablokowania endogennej aktywności peroksydacyjnej skrawki inkubowano w 0,3% metanolem w roztworze nadtlenu wodoru przez ok. 30 min. Po płukaniu w 0,1 M PBS o pH = 7,4, skrawki inkubowano z 10% roztworem normalnej surowicy koziej (NGS, Sigma Chemicals Co.) w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę, a następnie z pierwotnym króliczym przeciwciałem przeciwko VEGF (sc-507, Santa Cruz Biotechnology, Inc.) w rozcieńczeniu 1 : 200 w temperaturze pokojowej przez noc. Następnie, po płukaniu w 0,1 M PBS pH = 7,4 skrawki inkubowano przez 1 godzinę z biotynylowanym antykróliczym wtórnym przeciwciałem (Vectastain Kit ABC, Vector Lab, Inc., USA). Płukano w 0,1 M PBS, pH = 7,4, nakładano kompleks ABC (Vectastain Kit, Vector Lab, Inc., USA) i inkubowano przez 45 minut. Po płukaniu w 0,1 M PBS pH = 7,4 oraz buforze TRIS-HCl skrawki poddawano działaniu 3,3'-diaminobenzyny (DAB, Sigma Chemicals Co.) aż do momentu uzyskania brązowego produktu reakcji. Uzyskany w wyniku tej reakcji barwny produkt wyznaczał miejsce lokalizacji wykrywanego kompleksu antygen-przeciwciało. W celu sprawdzenia prawidłowości przeprowadzonej reakcji wykonano negatywną reakcję kontrolną, zastępując pierwotne przeciwciało NGS. Skrawki nie wykazywały zabarwienia.

Przegląd tkanek i dokumentację fotograficzną prowadzono w oparciu o skrawki seryjne za pomocą mikroskopu świetlnego (Nikon FXA, Japan).

Wyniki i omówienie

W grupie kontrolnej K_1 , w której zwierzęta otrzymywały wraz z paszą najmniejszą dawkę ZENn (tab. 1), struktura tkanek jajników była całkowicie zachowana (ryc. 1-3). Przekroje tkanek powierzchownej kory zwracały uwagę obecnością znacznie intensywniejszej reakcji dla VEGF w większości komórek spłaszczonego nabłonka pokrywowego jajnika oraz w śródbłonku podnabłonkowych kapilar (ryc. 1). Brak lub bardzo słabą reakcję dla tego czynnika prezentowały komórki ziarniste w różnej wielkości pęcherzykach wzrastających (ryc. 2). Silną immunohistochemiczną reakcję dla VEGF obserwowano w śródbłonku naczyń kapilarnych osłonek pęcherzyków wzrastających (ryc. 2) w większych naczyniach krwionośnych, zwłaszcza w śródbłonku naczyń żylnych kory (ryc. 3) oraz rdzenia jajnika.

Tab. 1. Stężenie ZEN w mieszankach paszowych grup kontrolnych i doświadczalnych ($n = 15$)

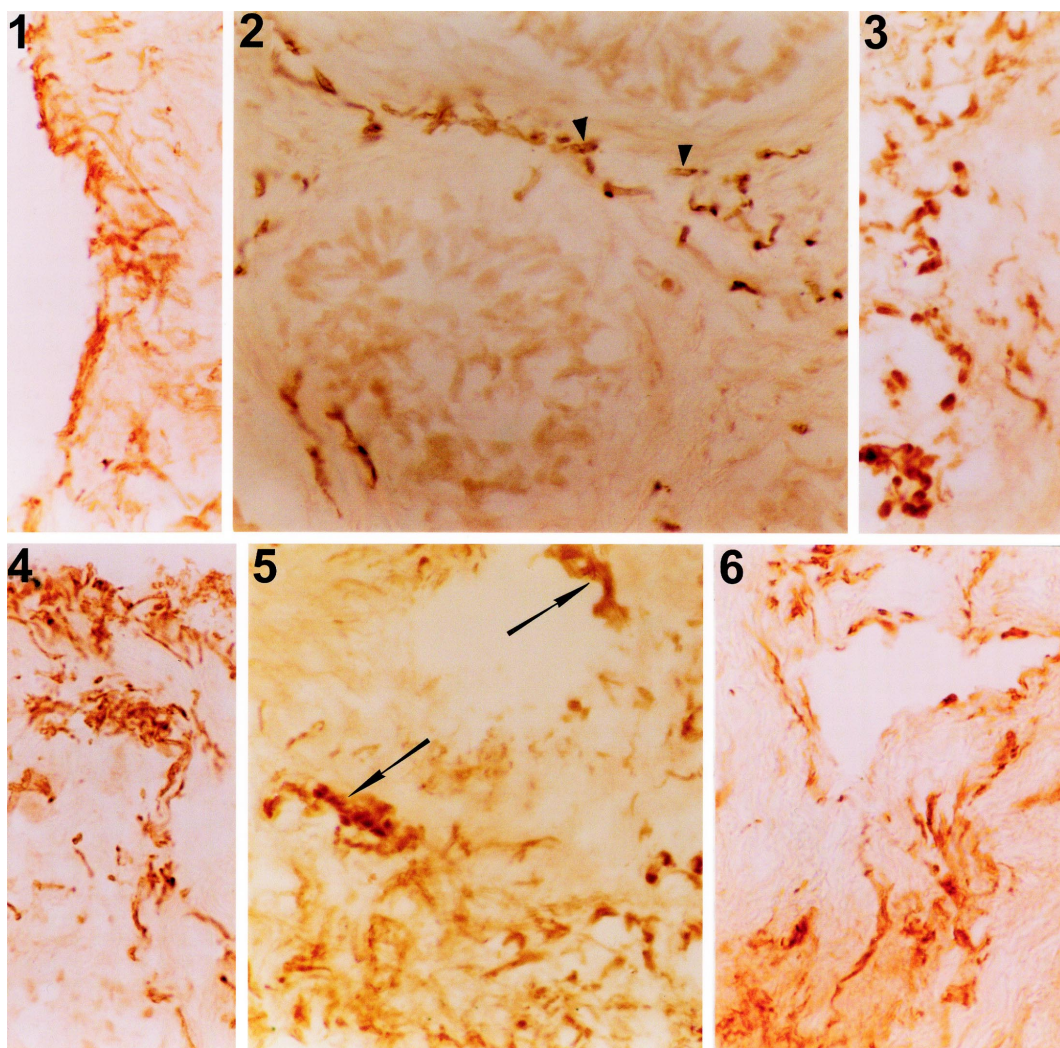
Grupa	Poziom skażenia ZENn i/lub dodatek ZENk, Mycofix Plus	Ogólne stężenie ZEN w paszy (μ g/kg)
K_1	Niski poziom ZENn	83
K_2	Niski poziom ZENn + ZENk	233
D_1	Wysoki poziom ZENn + F-A-T	586
D_2	Wysoki poziom ZENn + ZENk + F-A-T	1315
D_3	Wysoki poziom ZENn + Mycofix Plus	948

Objaśnienia: ZENn – zearalenon naturalny, ZENk – zearalenon krystaliczny

W grupie K_2 , gdzie loszki karmiono paszą o niskim poziomie zawartości ZEN naturalnego z dodatkiem ZEN krystalicznego (tab. 1), intensywniejsze zabarwienie, a zatem wzrost poziomu VEGF obserwowano głównie w komórkach nabłonka pokrywowego jajnika (rzc. 4). Często spotykane podnabłonkowe pęczki naczyń kapilarnych, docierające z głębi kory drogą międzypęcherzykowej tkanki łącznej z różnych okolic jajnika, wykazywały silną dla VEGF immunoreakcję we wszystkich komórkach tworzących ich ścianę (rzc. 4), podobnie jak opisywano w różnych zdrowych tkankach (13, 23-25). W największych pęcherzykach szczególną uwagę zwracał rozpad komórek ziarnistych. Z pozostałego kruszywa komórkowego tworzyły się dość duże pakiety o bardzo intensywniej immunoreakcji dla VEGF, które znajdowały się w jamie popęcherzykowej lub tkwiły w gruzowisku rozpadających się ścian (rzc. 5, strzałki).

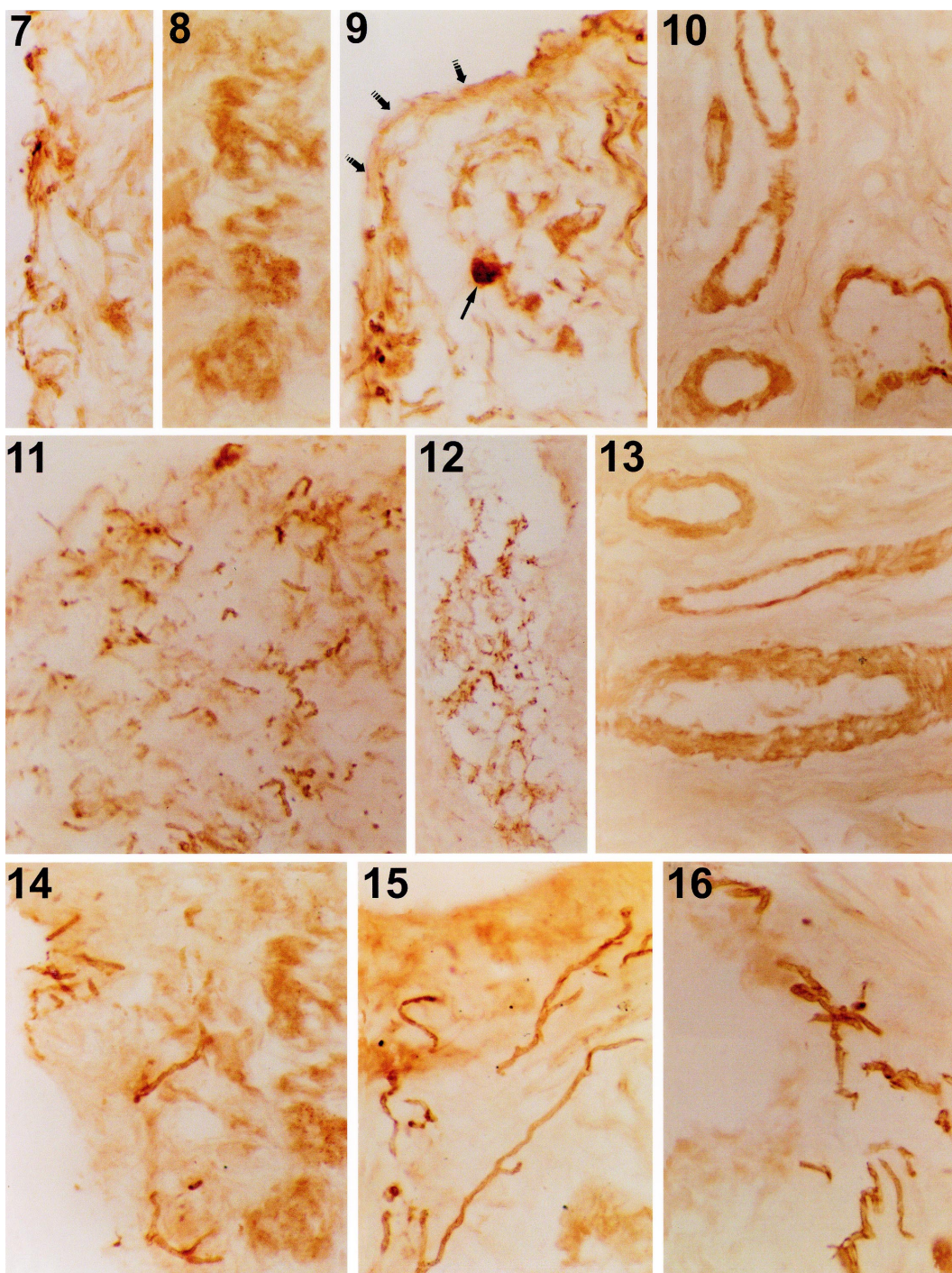
Jakkolwiek opisane zjawisko u młodych (40-dniowych) loszek mogło być typowym objawem atrezji, to jednak ze względu na brak podobnej właściwości u loszek z grupy K_1 nie można wykluczyć wpływu zwiększonej dawki ZEN. Dodatkowo, brak ciągłości w niektórych sieciach naczyń kapilarnych (zwłaszcza w osłonkach degenerujących pęcherzyków) potwierdzany był wyraźnym ich rozpadem i słabą immunoreakcją na VEGF (rzc. 5). Ponadto, na terenie warstwy rdzennej jajników obserwowano niewielkie uszkodzenia nabłonka wyściełającego naczynia krwionośne, w tym szczególnie naczyń żylnych (rzc. 6) oraz limfatycznych.

W grupach zwierząt doświadczalnych D_1 - D_3 wpływ ZEN zaznaczył się destrukcją tkanek jajników, współzależnie od wielkości poziomu jego stężenia w mieszkach paszowych (7). Obecne obserwacje wskazują także na współzależność z obecnością lub stopniem intensywności zabarwienia komórek nabłonka pokrywowego jajników dla VEGF w tych grupach.



PL. I. Immunohistochemiczna lokalizacja VEGF w tkankach jajników loszek z grup kontrolnych: K_1 – w nabłonku pokrywowym i podnabłonkowej tkance łącznej (rzc. 1), w obszarach pęcherzyków wzrastających o różnej wielkości (rzc. 2; ▲ – otwarte naczynia kapilarne) i naczyniach rdzenia (rzc. 3) oraz K_2 – w nabłonku pokrywowym jajnika i śródbłonku wiązki naczyń kapilarnych (rzc. 4), w jednym z pęcherzyków wzrastających z objawami destrukcji (rzc. 5; ➤ – pakiety zdegenerowanych komórek) oraz w niektórych naczyniach rdzenia (rzc. 6). Powiększenie rzc. 1-6: 625 ×

W grupie D_1 , przy najniższym stężeniu ZEN naturalnego w paszy i dodatku F-A-T (tab. 1), nabłonek pokrywowy był zachowany tylko w niektórych obszarach jajników. Niektóre komórki ukazywały pozytywną reakcję na VEGF, chociaż silniejszą w małych obkurczonych jądrach niż w spłaszczonej i skąpej cytoplazmie (rzc. 7). W podnabłonkowej tkance łącznej, podobnie jak w przestrzeniach międzypęcherzykowych kory jajnika, bardzo słabą reakcję wykazywały tylko fragmenty obkurczonych naczyń kapilarnych (rzc. 7 i 8). Szczególną uwagę zwracały tkwiące w niej zdegenerowane pęcherzyki pierwotne o słabej VEGF immunoreakcji (rzc. 8). VEGF występował także w niektórych komórkach tkanki łącznej i śródbłonku naczyń kapilarnych. Na przekrojach widoczne były także duże pęcherzyki, które należały do elementów najbardziej zdegenerowanych pośród jajników tej grupy zwierząt. Pęcherzyk (rzc. 9) umieszczony pod wąskim pasmem tkanki łącznej nie posiadającej pokrywy nabłonkowej



PL. II. Lokalizacja VEGF w jajnikach loszek w grupach doświadczalnych: D_1 – w nablonku pokrywowym i podnablonkowej tkance łącznej (ryc. 7), w zdegenerowanych pęcherzykach pierwotnych (ryc. 8), w zdegenerowanym i dużym pęcherzyku wzrastającym (ryc. 9; ➤ – zdegenerowane jądro komórki rozrodczej, ➡ – brak pokrywy nablonkowej jajnika), w naczyniach rdzenia jajnika (ryc. 10), D_2 – w zdegenerowanej korze (ryc. 11), w segmencie naczynia limfatycznego (ryc. 12) i naczyniach rdzenia (ryc. 13) oraz w grupie D_3 – we fragmentach nowo powstałych naczyń kapilarnych w powierzchownej korze (ryc. 14) oraz tworzących się sieciach kapilarnych wokół pęcherzyków różnej wielkości (ryc. 15 i 16). Powiększenie ryc. 7-16: 625 ×

jajnika, wykazuje degenerację zarówno w komórce rozrodczej, jak i w obszarach jego ścian. Natomiast najsilniejszą immunoreakcję dla VEGF wśród badanych tkanek odnotowano w zdegenerowanych jądrach komórek rozrodczych i w pęcherzykach wzrastających. Jednak nieadekwatna nazwa dla tych struktur – „pęcherzyki wzrastające” wskazuje, iż posiadają one oznaki degeneracji, tj. deformacja, obkurczenie i pofałdo-

wanie ścian, rozpad i zanik komórek ziarnistych, w tym wzgórka jajonośnego, podobnie jak degradacja i rozpad komórki jajowej (ryc. 9). Natomiast najniższy wpływ ZEN w jajnikach zwierząt grupy D_1 odnotowano w warstwie rdzennej, gdzie naczynia krwionośne i chłonne zachowywały nie tylko właściwą strukturę ścian, ale także podobną intensywną reakcję (ryc. 10), jaką wykazywano w nieuszkodzonych zdrowych tkankach (14, 21, 26). Można zatem wnioskować, iż w grupie D_1 , pomimo wprowadzenia dodatku absorbera mikotoksyn – F-A-T (tab. 1), immunoreakcja dla VEGF występowała z różnym nasileniem w zdegenerowanych elementach kory jajników.

Najbardziej zaawansowany stopień degradacji przedstawiały tkanki kory jajników świń z grupy D_2 (ryc. 11-13). Pomimo dodatku F-A-T, jajniki nie posiadały prawie na całej powierzchni nabłonka pokrywowego. Natomiast elementami wypełniającymi cały obszar byłej kory stanowiło gruzowisko złożone z fragmentów różnych tkanek. Pośród nich uwagę zwracały drobne elementy wykazujące silną immunoreakcję na VEGF, sugerujące powstawanie zaczątków drobnych naczyń kapilarnych (ryc. 11). Mniejszą

degradacją tkanek charakteryzowały się elementy rdzenia jajników, na który składały się różne naczynia krwionośne i chłonne. Jednak niektóre z nich ukazywały zaawansowany stopień destrukcji i rozpadu, zwłaszcza cienkościenne naczynia limfatyczne. W wielu przypadkach pojawiały się charakterystyczne segmenty tych naczyń pozbawione całkowicie śródbłonna i wypełnione drobnymi elementami, o silnej im-

munoreakcji na VEGF (ryc. 12). Pozostałe naczynia, w tym różnej wielkości przekroje naczyń tętniczych i żylnych, wykazywały różny stopień immunoreaktywności dla VEGF. Brak było jednak większego zróżnicowania w różnych tkankach tworzących ich ściany (ryc. 13).

W jajnikach loszek grupy D₃ (tab. 1) zaobserwowano właściwości związane z odbudową sieci naczyń kapilarnych (ryc. 14-16). Pomimo braku lub obecności tylko fragmentów nabłonka pokrywowego jajników, w podpowierzchniowej okolicy tkanki łącznej zwracały uwagę pojedyncze lub niewielkie skupiska nowo powstałych naczyń kapilarnych (ryc. 14). Niezależnie od tego obserwowano długie, pojedyncze gałązki podobnych cienkościennych naczyń, które znajdowały się w osłonkach pęcherzyków wzrastających (ryc. 15) jakkolwiek, tylko w przypadku pęcherzyków o zaawansowanym wzroście i rozwoju znajdowano ukształtowane, o dobrze rozwiniętej sieci naczyń kapilarnych o intensywnej immunoreaktywności dla VEGF w poszczególnych ich komórkach (ryc. 16). Można zatem przypuszczać, że w przypadku świń użytych do badań w grupie D₃, pomimo destrukcji wielu pęcherzyków, w tym głównie pierwotnych, część z nich może zachować właściwości dla dalszego rozwoju i dojrzewania, dzięki wykrytej możliwości dostarczania potrzebnych produktów drogą rozwijających się sieci opisanych naczyń krwionośnych. Z drugiej strony, w omawianych procesach, nie można wykluczyć udziału preparatu Mycofix Plus, stosowanego w celu obniżenia poziomu naturalnie występującego zearalenonu w paszy. W porównaniu z wcześniejszymi badaniami nad wpływem zearalenonu na powstawanie niekorzystnych zmian w różnych tkankach macicy (6) i jajników świń (7) obecne badania sugerują, iż do wysokości poziomu około 950 mg ZEN/kg paszy wprowadzenie Mycofix Plus może uchronić tkanki jajników od całkowitego pozbawienia właściwych im funkcji.

Piśmiennictwo

1. Anon.: Safety evolution of certain in food additives. 53rd Report. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives WHO Food Additives 2000, Series 44.
2. Anon.: Cz. 2: Zearalenone (ZEA). Opinion of The Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins, 22 June 2000, 1-12.
3. Breir G., Albrecht U., Strerger S., Risau W.: Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992, 114, 521-532.
4. Brown F. L., Berse B., Jackman R. W., Tognazzi K., Mansen E. J., Dvorak H. F., Senger D. R.: Increased expression of vascular permeability (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinoma. *Am. J. Pathol.* 1993a, 143, 1255-1262.
5. Brown F. L., Berse B., Jackman R. W., Tognazzi K., Mansen E. J., Senger D. R., Dvorak H. F.: Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.* 1993b, 53, 4727-4735.
6. Doboszyńska T., Jarczyk A., Postek A.: Wpływ zearalenonu na strukturę rogów macicy u młodych loszek. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 274-277.
7. Doboszyńska T., Jarczyk A., Rogiewicz A., Jana B., Andronowska A., Postek A.: Wpływ zearalenonu na strukturę jajników u niedojrzałych loszek. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 430-434.
8. Etienne M., Dourmad J.: Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction sows. *Livestock Prod. Sci.* 1994, 40, 99-107.
9. Ferrara N., Houck K., Jakeman L., Leung D. W.: Molecular and geological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocrinol. Rev.* 1992, 13, 18-32.
10. Gajęcki M.: Zearalenon jako czynnik stanów subklinicznych świń. *Mag. Wet. (Supl. Świnie)* 2002, 45-48.
11. Green M. L., Diekman M. A., Malayer J. R., Scheid A. B., Long G. G.: Effect of prepubertal consumption of zearalenone on puberty and subsequent of gilts. *J. Anim. Sci.* 1990, 68, 171-178.
12. Grustein J., Masbad J. J., Hickey R., Giordano F., Johnson R. S.: Isoform of vascular endothelial growth factor act in coordinate fashion to recruit and expand tumor vasculature. *Mol. Cell. Biol.* 2000, 20, 7282-7289.
13. Hazzard T. M., Stouffer R. L.: Angiogenesis in ovarian follicular and luteal development. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Obstet Gynecol.* 2000, 14, 883-900.
14. Jakeman L. B., Armannii M., Philips H. S., Ferraga N., Williams L. T.: Developmental expression of binding sites and messenger ribonucleic acid for this protein in vasculogenesis and angiogenesis. *Endocrinology* 1993, 133, 848-859.
15. Jana B., Skwarski R.: Wpływ zearalenonu na funkcje rozrodcze zwierząt. *Medycyna Wet.* 1988, 54, 667-670.
16. Kuiper-Goodman T.: Uncertainties in the risk assessment of there mycotoxins: aflatoxin, ochratoxin and zearalenone. *Cam. J. Physiol. Pharmacol.* 1990, 68, 1017-1024.
17. Lee C. N., Cheng W. F., Chu J. S., Hsieh C. V., Hsieh F. F.: Angiogenesis of endometrial carcinomas assessed by measurement of intraluteal blood flow, microvessel density, and vascular endothelial growth factor levels. *Obstet. Gynecol.* 2000, 96, 615-621.
18. Neufeld G., Tessler S., Gitay-Goern H., Cohen T., Levi B. Z.: Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Prog. Growth Factor Res.* 1994, 5, 89-97.
19. Pejsak Z.: Mikotoksyny – przyczyna zaburzeń w rozrodcie oraz zachorowań świń. *Medycyna Wet.* 1997, 53, 246-249.
20. Placinta C. M., D'Mello J. P. F., Macdonald A. M. C.: A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with Fusarium mycotoxins. *Anim. Feed Sci. Technol.* 1999, 78, 21-37.
21. Quinn T. P., Peters K. G., De Vries C., Ferrara N., Williams L. T.: Fetal liver Kinase 1 is a receptor for vascular endothelial growth factor and is selectively expressed in embryonic vascular endothelium. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1983, 90, 7533-7537.
22. Ravindranath N., Little-Ihving. L., Philips H. S., Ferrara N., Zelezik A. J.: Vascular endothelial growth factor mRNA expression in the primate ovary. *Endocrinology* 1992, 131, 254-269.
23. Reynolds L. P., Redmer D. A.: Expression of the angiogenic factor, basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor, in the ovary. *J. Anim. Sci.* 1998, 76, 1672-1681.
24. Reynolds L. P., Redmer D. A.: Expression of the angiogenesis in the corpus luteum. *Endocrine* 2000, 12, 1-9.
25. Rieke W. A., Redmer D. A., Reynolds L. P.: Growth and cellular proliferation of pig corpora lutea throughout the estrous cycle. *J. Reprod. Fertil.* 1999, 117, 369-377.
26. Shibuya M., Yamaguchi S., Yamane A., Ikade T., Tojo Matsuhime H., Sato M.: Nucleotide sequence and expression of a novel human receptor type tyrosine kinase (flt) closely related to the fms family. *Oncogen* 1990, 8, 519-527.

Adres autora: prof. dr hab. Teresa Doboszyńska, ul. Tuwima 10, 10-747 Olsztyn; e-mail: teresa@pan.olsztyn.pl