

Cytotoksyczność salinomycyny i lazalocydu wobec hepatocytów modelowej linii komórkowej szczura^{*)}

LIDIA RADKO, WOJCIECH CYBULSKI, WOJCIECH RZESKI*,**

Zakład Toksykologii i Ochrony Środowiska Katedry Przedklinicznych Nauk Weterynaryjnych
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej AR, ul. Akademicka 12, 21-033 Lublin

*Zakład Wirusologii i Immunologii Wydziału Biologii i Nauk o Ziemi UMCS, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin

**Zakład Toksykologii Instytutu Medycyny Wsi, ul. Jaczewskiego 2, 20-950 Lublin

Radko L., Cybulski W., Rzeski W.

Cytotoxicity of salinomycin and lasalocid in a model hepatocyte cell line of a rat

Summary

The aims of the study were determining the median cytotoxicity indicate (IC_{50}), nature of cell death (apoptosis/necrosis), assessment and morphology of changes observed in FAO cell line culture of hepatocytes subjected to ionophore antibiotics, salinomycin and lasalocid, incubations.

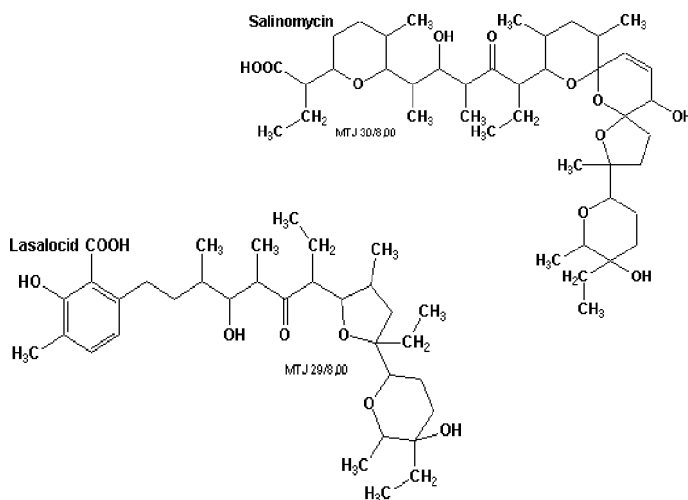
INVTTOX recommended MTT, NRU and KB cytotoxicity tests were used to research mitochondrial, protein synthesis and cell proliferation. In addition cell staining in order to reveal membrane destruction that established cell death character May-Grunwald & Giemsa staining were also conducted. Cytotoxicity indices (IC_{50}) estimated by the 24 hour MTT test were at a level 2.41 ± 0.29 mM and 7.93 ± 0.01 mM; however, after a 48 hour incubation the values lowered to 0.112739 ± 0.01 mM and 0.59 ± 0.01 mM for salinomycin and lasalocid, respectively. In contrast to the MTT data, that of NRU and KB tests were higher, indicating mitochondria as the main subcellular target for the antibiotic action. The determined IC_{50} values were positively related to DL_{50} (the data from references). Hepatocytes death were established to be of an apoptosis nature. Cell morphology was changed from IC_{50} depending on manner; the lower value of the indicate corresponded to more pronounced cytopathologic findings. Summarizing, monolayer cell cultures of rat hepatocytes proved to serve as a useful model for cytotoxicity studies enabling to indicate subcellular targets for ionophore antibiotics.

Keywords: salinomycin, lasalocid, hepatotoxicity, cell lines

Salinomycyna i lazalocyd należą do antybiotyków jonoforowych (polieterowych), otrzymywanych na drodze fermentacji tlenowej ze szczepów *Streptomyces sp.*: salinomycyna – *S. albus*, lazalocyd – *S. lasaliensis*. Są związkami o złożonej wielopierścieniowej budowie (ryc. 1). Prowadzą do niespecyficznego transportu jonów w obu kierunkach, nie uszkadzając błon komórkowych. Transport ten jest bardzo wydajny, gdyż w przypadku salinomycyny jej jedna cząsteczka ma możliwość przeniesienia 10^4 jonów w ciągu sekundy. Przy zatruciu antybiotykami jonoforowymi przesunięciom podlegają przede wszystkim jony K^+ , Na^+ , H^+ (12, 14), natomiast lazalocyd także ma powinowactwo do jonów dwuwartościowych Ca^{2+} , Mg^{2+} i amin biogennych (1). Pomimo rozpoznanego mechanizmu toksyczności, wrażliwość komórek wątrobowych mierzona wskaźnikami cytotoksyczności podstawowej nie została określona.

Jonofory wykorzystywane są w profilaktyce drobiu jako kokcydiostatyki, a do niedawna jako stymulatory

wzrostu w formie dodatków paszowych; lazalocyd (Avatec) – 75-125 ppm, a salinomycyna (Sacox, Coxistac) – 40-60 ppm (18). Wzorem innych krajów UE, jonofory z początkiem 2006 r. wycofywano z obrotu jako stymulatory wzrostu. Zgodnie z zaleceniami, stosowanie anty-



Ryc. 1. Wzory strukturalne substancji użytych w doświadczeniu

^{*)} Badania częściowo finansowane ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego oraz budżetu państwa w ramach Zintegrowanego Programu Operacyjnego Rozwoju Regionalnego, działania 2.6. Regionalne Strategie Innowacyjne i Transfer Wiedzy, projekt: Prace naukowe doktorantów AR szansą dla lubelskiego rynku innowacji.

biotyków paszowych przechodzi pod kontrolę służby weterynaryjnej. Jako pasze lecznicze ordynowane są przy pojawieniu się w stadzie kokcydiozy, a salinomycyna i lazalocyd są lekami z wyboru spośród wielu innych przedstawicieli tej grupy antybiotyków (5, 6, 8). Nieodpowiednie podawanie antybiotyków jonoforowych (przedawkowanie, nierównomierne rozproszanie w paszy, łączne stosowanie z innymi lekami lub dodatkami paszowymi) było przyczyną wielu zatruc. Wynika to z wąskiego marginesu bezpieczeństwa, małej rozpiętości pomiędzy dawką leczniczą a toksyczną. Przyjmuje się, że przekroczenie zalecanych dawek kokcydiostatyków o 20-50% może wywołać objawy toksyczne. Poszczególne substancje charakteryzuje zróżnicowana toksyczność dla poszczególnych gatunków zwierząt, salinomycyna nie jest wskazana dla indyków i kurcząt hodowanych na nioski, a lazalocyd dla kur niosek i kurek z genem karłowatości. Cytotoksyczność tych związków ujawnia się głównie w komórkach wątrobowych i mięśniowych (20). Po stosowaniu tych związków obowiązuje 5-dniowy okres karencji, jednakże ich pozostałości stwierdzano w badaniach monitoringowych tkanek i jaj kurzych (9, 11, 21).

Celem badań było określenie aktywności hepatocytotoksycznej salinomycyny i lazalocydu na podstawie wskaźników połowicznych efektów hamujących (IC_{50}), oraz rozpoznanie zmian patomorfologicznych i charakteru wywoływanej śmierci szczurzych hepatocytów linii ciągłej FAO eksponowanych na badane kokcydiostatyki w hodowli komórkowej.

Materiał i metody

Badanie wykonano na linii ciągłej hepatocytów szczurzych FAO, pochodzącej z banku komórek ECACC Salisbury, Wiltshire, UK. Komórki hodowano w podłożu Hamsa F-12K (MP Biomedical USA) z dodatkiem 10% płodowej surowicy bydłowej, FBS, (Sigma). Następnie poddawano je inkubacji w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂. Po uzyskaniu jednolitej warstwy (monolayer), co wymagało 24 godzin inkubacji, komórki odklejało się od podłoża za pomocą 0,25% roztworu trypsyny (Sigma). Zawieszono je ponownie w świeżym podłożu hodowlanym z dodatkiem 10% FBS. Zawiesinę o gęstości $2,5 \times 10^6$ komórek/ml podłoża rozlano do plastikowych płytek (NUNC, 96-well) po 100 µl/studzienkę i prowadzono inkubację przez 24 godziny (19). Tak przygotowane hepatocyty stosowano w kolejnych etapach badań.

Roztwory salinomycyny i lazalocydu (Sigma) przygotowano bezpośrednio przed wykonaniem doświadczenia. W tym celu antybiotyki zostały rozpuszczone w DMSO (Sigma). Z roztworu podstawowego sporządzono roztwory robocze o pożądanym stężeniu, wykorzystując podłoże hodowlane jako rozpuszczalnik. Po usunięciu podłoża hodowlanego ze studzienek, umieszczono w nich roztwory testowanych substancji o różnych stężeniach (8 powtórzeń na każde stężenie). Końcowe stężenie DMSO w mieszaninie inkubacyjnej wynosiło 0,25%. Po 24 i 48 godzinach inkubacji, przeprowadzono poszczególne testy w celu oceny działania cytotoksycznego badanych związków.

Wykorzystano test MTT wg INVITTOX-u, protokół 17 (4). Po upływie 24 i 48 godzin inkubacji do hodowli komórkowych dodano 10 µl roztworu MTT na studzienkę, a po następnych 3 godzinach dodano 100 µl 10% SDS w 0,01 N HCl/studzienkę. Po 24 godzinach inkubacji dokonano odczytu

absorbancji przy długości fali $\lambda = 570$ nm w automatycznym czytniku mikroplątek E-max (Molecular Devices Corp., Menlo Park, Ca, USA).

Test NRU (Neutral Red Uptake) wykonano w oparciu o metodę INVITTOX, protokół 54 (3). Po upływie 24 i 48 godzin inkubacji w temperaturze 37°C w atmosferze 5% CO₂ usunięto roztwory, a do studzienek dodano po 100 µl roztworu czerwieni obojętnej. Po 3 godzinach inkubacji usuwano roztwór barwnika z nadkomórek i dodawano po 100 µl mieszaniny elucyjnej. Po 30 min. inkubacji w temperaturze pokojowej płytkę wytrząsano przez 5 minut i odczytywano absorbancję przy długości fali $\lambda = 550$ nm.

Test KB wykonano wg metody INVITTOX, protokół 3b (2). Po przeprowadzeniu wymienionych etapów inkubacyjnych i usunięciu mieszaniny elucyjnej, dodano po 100 µl roztworu Kenacid Blue. Po 10 minutach usunięto nadmiar niezwiązanego barwnika KB, komórki dwukrotnie przepłukano i przez 10 minut wytrząsano. Następnie dodano 100 µl mieszaniny desorbującej. Odczytu dokonano przy długości fali $\lambda = 600$ nm.

Po przeprowadzonych inkubacjach wykonano również test umożliwiający rozróżnienie komórek nekrotycznych od apoptycznych. Pod mikroskopem fluorescencyjnym przy długości fali 420 nm (filtr dla UV) komórki nekrotyczne wykazywały wobec jodku propidyny (Sigma) bladą różową fluorescencję, natomiast barwa jasnoniebieska po dodaniu barwnika fluorochromowego (Hoechst 33342-HO342) charakteryzowała komórki apoptyczne.

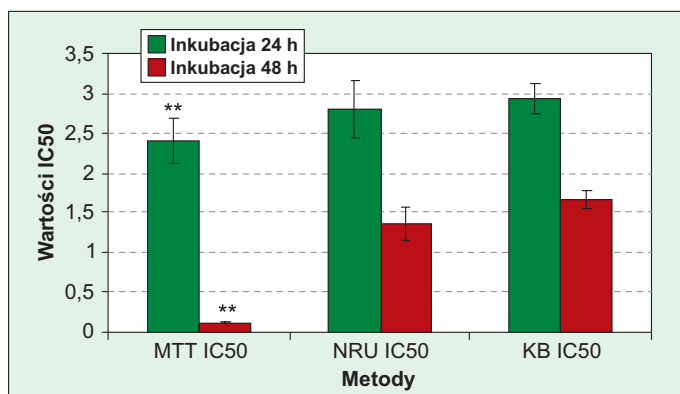
Badania mikroskopowe prowadzono po uprzednim barwieniu preparatów z hodowli hepatocytów metodą May-Grünwald i Giemsa. Zmiany patomorfologiczne w komórkach wywołane działaniem badanych jonoforów obserwowano pod mikroskopem świetlnym Olympus BX51 z zastosowaniem programu komputerowego analizySIS^R.

Analizę statystyczną przeprowadzono w oparciu o dwuczynnikową analizę wariancji ANOVA i test Tukeya.

Wyniki i omówienie

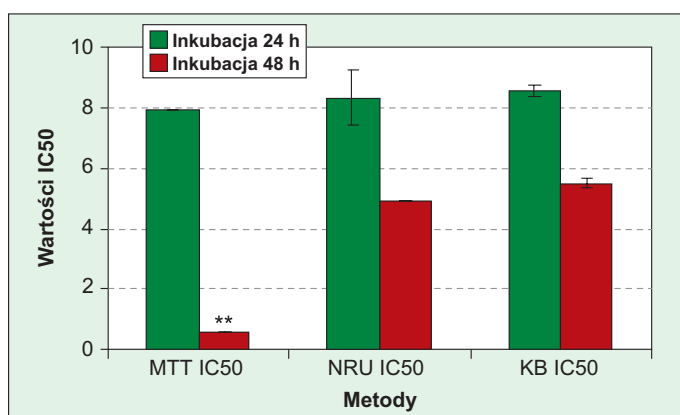
Zastosowane testy MTT, NRU i KB pozwoliły na określenie cytotoksyczności podstawowej obu badanych związków w warunkach *in vitro* poprzez obliczenie współczynników IC_{50} (ryc. 2 i 3). Różne wartości IC_{50} w trzech zastosowanych testach wskazują na różnego stopnia nasilenie dysfunkcji badanych procesów i/lub uszkodzeń struktur subkomórkowych. Odnosi się to do zaburzeń metabolizmu mitochondrialnego (test MTT), syntezy białka komórkowego i proliferacji (test KB) oraz uszkodzeń błon komórkowych hepatocytów (test NRU).

Ekspozycja hodowli komórkowych na badane kokcydiostatyki pozwoliła na stwierdzenie pogłębiających się efektów cytotoksycznych wraz z czasem jej wydłużania. W przypadku testu MTT po 48 godz. inkubacji wyniki IC_{50} były niższe o 92,5% i 95,2% odpowiednio dla lazalocydu i salinomycyny w porównaniu do ich wartości po 24 godz., co jest potwierdzone statystycznie istotnością różnic między grupami. Podobnie przy porównaniu wyników uzyskanych w testach NRU i KB wykazano statystycznie istotne różnice między 24- i 48 godz. czasami inkubacji, jakkolwiek czas inkubacji wpływał w mniejszym stopniu niż w teście MTT; wartości te były niższe o 35,6% i 51,3% w stosunku do 24 godz. inkubacji (ryc. 2, 3). Dane te wskazują na wrażliwość wybranych ele-



Ryc. 2. Średnie wartości IC₅₀ (µM) salinomycyny oznaczone za pomocą testów MTT, NRU KB w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji hepatocytów

Objaśnienie: ** – różnica statystycznie istotna ($p < 0,01$)



Ryc. 3. Średnie wartości IC₅₀ (µM) lazalocydu wyznaczone za pomocą testów MTT, NRU KB w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji hepatocytów

Objaśnienie: jak na ryc. 2.

mentów komórkowych – najbardziej zaznaczonej dla mitochondriów – miejsc docelowego działania badanych jonoforów.

Równoczesne określenie IC₅₀ dla thiuramu, fungicydu użytego w celu porównawczym, pozwoliło na pozytywną kontrolę metodyki z uwagi na jego badanie w poprzedniej pracy (13). Ponadto stwierdzono, iż siła cytotoksodynamiczna thiuramu mierzona wskaźnikiem IC₅₀ w czasie 24- i 48-godzinnej inkubacji wynosiła odpowiednio $2,4 \pm 0,17$ - $2,80 \pm 0,12$ µM i $1,7 \pm 0,25$ - $1,95 \pm 0,23$ µM (zakres wyników z testów MTT, NRU i KB – ryc. 2, 3). Odpowiadało to wskaźnikom cytotoksyczności podstawowej salinomycyny w testach NRU i KB: $2,8 \pm 0,88$ µM i $2,95 \pm 0,47$ µM oraz $1,36 \pm 0,53$ µM i $1,67 \pm 0,28$ µM, a dane dla lazalocydu wynosiły $8,35 \pm 0,93$ µM i $8,55 \pm 0,45$ µM oraz $4,9 \pm 0,06$ µM i $5,5 \pm 0,33$ µM, odpowiednio dla 24- i 48-godzinnych czasów inkubacji. Natomiast wyniki IC₅₀ z testu MTT po 24 godz. inkubacji wynosiły $2,4 \pm 0,71$ µM i $7,92 \pm 0,17$, obniżając się znacznie po 48 godz. inkubacji; do $0,11 \pm 0,01$ µM dla salinomycyny i $0,6 \pm 0,03$ µM – lazalocydu (ryc. 2, 3).

Z wymienionych danych wynika, iż lazalocyd charakteryzował się niższą cytotoksycznością (wyższe wartości IC₅₀ we wszystkich testach) w porównaniu z salinomycyną zarówno w 24-, jak i 48-godzinnej hodowli. Oznaczone wskaźniki cytotoksyczności podstawowej

korrespondują z danymi piśmiennictwa toksyczności ostrej, LD₅₀ dla szczura wynosi odpowiednio dla lazalocydu 122 mg/kg m.c., salinomycyny 50 mg/kg m.c. (15, 16). Natomiast w porównaniu z uzyskanymi wynikami badań cytotoksyczności monenzyny i narazyny w poprzednich badaniach (19), występują różnice wartości IC₅₀. Wielkości te są znacznie niższe w porównaniu z salinomycyną i lazalocydem. Dotyczy to w szczególności wartości IC₅₀ testu MTT, w którym monenzynę charakteryzowała cytotoksyczność przekraczająca o dwa rzędy wielkości odpowiadające wyniki dla lazalocydu. Wskazuje to na duże różnice między poszczególnymi lekami z grupy jonoforów w zakresie ukierunkowanej cytotoksyczności wobec frakcji subcellularnych komórek docelowych. Wyniki te informują o dominującym efekcie toksodynamicznym wobec mitochondriów. Zwiększał się on w miarę wydłużania czasu narażenia na badane związki (1, 11).

Oba antybiotyki należą do grupy tzw. ruchomych jonoforów, które, tworząc lipofilne kompleksy z jonami, przemieszczają się wraz z nimi przez błony komórkowe. Doprowadza to do zaburzeń w funkcjonowaniu błon komórkowych, pociągając za sobą kaskadę przemian prowadzących do zaburzeń równowagi jonowej pomiędzy wnętrzem komórki i płynem międzykomórkowym. Utrudniony transport kationów dwuwartościowych jest przyczyną zaburzeń z działaniu pompy sodowo-potasowej, obniżenia produkcji ATP i zaburzeń równowagi sodowo-wapniowej, który doprowadza do wzrostu stężenia jonów wapniowych wewnątrz komórki (16). Zwiększony napływ jonów wapnia zmusza mitochondria do ich magazynowania w celu utrzymania homeostazy. W momencie przeładowania mitochondriów wapniem następuje zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej, co prowadzi do śmierci komórki (20). Mechanizm działania antybiotyków jonoforowych doprowadza w konsekwencji do szybkiego zubożenia wewnątrzkomórkowych zasobów energetycznych (ATP), zaś uszkodzenie struktur mitochondrialnych prowadzi do śmierci energetycznej komórki.

Z drugiej strony, w rozważaniach nad mechanizmem toksyczności należy brać pod uwagę proces metabolizmu obu związków katalizowanych przez enzymy mikrosomalne. Prowadzić on może do powstania toksycznych metabolitów, w tym reaktywnych – elektronofilnych i wolnorodnikowych pochodnych badanych antybiotyków. Należy przypuszczać, że zmiany aktywności dehydrogenazy bursztynianowej, uwalnianej z uszkodzonych mitochondriów, mierzonej za pomocą testu MTT mogą być również efektem tego drugiego mechanizmu indukowanego przez reaktywne metabolity (10).

Wykazano, że śmierć komórek poddanych działaniu salinomycyny i lazalocydu była natury apoptycznej. Wskazuje na to ryc. 4., na której jasnoniebieska fluorescencja hepatocytów poddanych działaniu jonoforów w ilościach oznaczonych wartościami IC₅₀ świadczy o ich na apoptozie. O apoptozie lub nekrozie komórki decyduje poziom jej zasobów energetycznych, co związane jest z aktywnością metaboliczną mitochondriów. W wyniku uszkodzenia błon komórkowych przez antybiotyki jonoforowe dochodzi do obniżenia błonowego

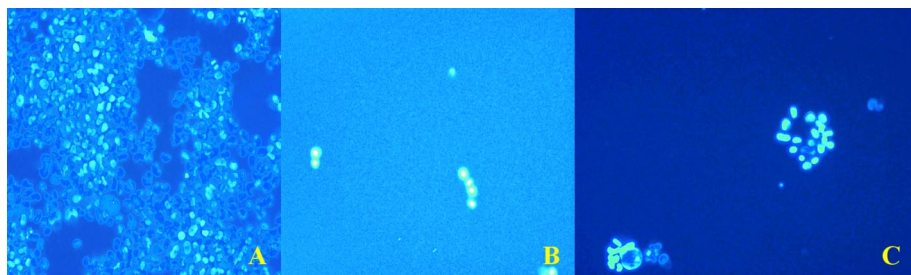
potencjału mitochondrialnego. Prowadzi to do spadku poziomu ATP, który odgrywa istotną rolę w procesie śmierci komórki. Z drugiej strony, o charakterze śmierci, apoptycznej lub nekrotycznej, komórki decyduje rodzaj i dawka czynnika indukującego cytotoksyczność, czas jego ekspozycji na komórki oraz rodzaj komórek poddanych działaniu tego czynnika (10, 17). W konsekwencji apoptozę i/lub nekrotyczną może indukować ten sam czynnik. Qian (17) zaobserwował nekrotyczną śmierć komórek wątrobowych pod wpływem działania Br-A23187. Odmienne spostrzeżenia poczynili inni autorzy, rozpoznając apoptyczny mechanizm śmierci hepatocytów wywołanej przez monenzynę (18). Wykonane badanie mikroskopowe komórek wątroby inkubowanych z dodatkiem badanych jonoforów w stężeniu obniżającym o 50% oznaczane wskaźniki cytotoksyczności w porównaniu z kontrolą, pozwoliło zaobserwować zmniejszenie wymiarów hepatocytów, ale zachowywały one swoją typową budowę. Stwierdzono także obecność komórek o zmienionym, wydłużonym kształcie. Ponadto obserwowano zbite ich masy, wykazujące cechy obrzmienia i zatartą budowę komórkową (ryc. 5).

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań antybiotyków jonoforowych w hodowlach jednowarstwowych hepatocytów szczurzych należy stwierdzić, iż okazały się one przydatnym modelem do badań cytotoksyczności podstawowej salinomycyny i lasalocydu oraz monenzyny i narazyny w poprzednich badaniach (19). Wykazano odmienne działanie uszkodzające badanych jonoforów, które zaburzały w różnym stopniu funkcjonowanie struktur subkomórkowych hepatocytów linii FAO szczura. Ocenę umożliwiło zastosowane techniki *in vitro* z ustalonymi stężeniami substancji na poziomie wywołujących połowicznych efektów cytotoksycznych, IC_{50} . Cytotoksikologiczna ocena czterech przebadanych jonoforów pozwoliła na wskazanie lasalocydu jako najbezpieczniejszego z uwagi na jego najwyższe wartości IC_{50} , aczkolwiek wykazywał on działanie apoptyczne i doprowadzał do zmian morfotycznych badanych hepatocytów w hodowlach komórkowych.

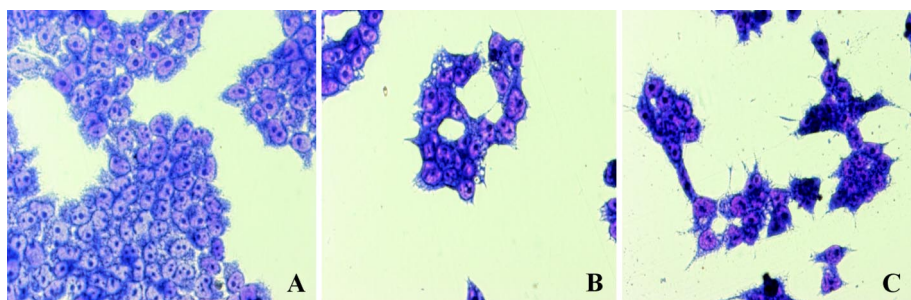
Uzyskane wyniki stanowią podstawę dalszych badań zmierzających do rozpoznania działania środków ochronnych/detoksykacyjnych w przypadku leczniczego stosowania antybiotyków jonoforowych. Wymaga to wprowadzenia badań *in vitro* z zastosowaniem komórek zwierząt docelowych, a także weryfikacji tych wyników doświadczeniami *in vivo* w warunkach prowadzonej terapii.

Piśmiennictwo

1. Aouad N., Miquel-Mercier G., Bienvenite E.: Lasalocid (X537A) as a selective carrier for Cd(II) in supported liquid membranes. *J. Membr. Sci.* 1998, 139, 167-174.



Ryc. 4. Obraz fluorescencji hepatocytów (pow. $\times 200$) poddanych działaniu salinomycyny i lasalocydu w ilościach określonych jako średnie IC_{50} z trzech testów (MTT, NRU, KB) (barwienie za pomocą jodku propiolinowego i Hoechst 33342) Objaśnienia: A – kontrola; B – działanie salinomycyny; C – działanie lasalocydu



Ryc. 5. Obraz hepatocytów (pow. $400 \times$) poddanych działaniu salinomycyny i lasalocydu w ilościach określonych jako średnie IC_{50} z trzech testów (MTT, NRU, KB) (barwienie metodą May-Grünwalda-Giemsy) Objaśnienia: jak na ryc. 4.

- Anon.: INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology – The FRAME cytotoxicity test (Kenacid Blue) 1992, Nr 3b.
- Anon.: INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology – The Neutral Red cytotoxicity assay 1992, Nr 54.
- Anon.: INVITTOX – The ERGATT/FRAME Data Bank of In Vitro Techniques in Toxicology – MTT assay 1990, Nr 17.
- Anon.: Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 2037/2005 z dnia 14 grudnia 2005 r.
- Anon.: Rozporządzenie Komisji (WE) Nr 2037/2005 z dnia 13 lutego 2006 r.
- Anon.: Ustawa z dnia 22 lipca 2006 r. o paszach. *Dz. U.* 2006, Nr 144, poz. 1045.
- Anon.: Zalecenie Urzędu Nadzoru EFTA Nr 59/05/COL z dnia 5 kwietnia 2005 r. w sprawie skoordynowanego programu inspekcji w zakresie żywienia zwierząt na 2005 r.
- Harris J., Russell Ch., Wilkins J.: The characterization of polyether ionophore veterinary drugs by HPLC-electrospray MS. *Analyst.* 1998, 123, 2625-2628.
- Kowaltowski A., Vercesi A.: Mitochondrial damage induced by conditions of oxidative stress. *Free Radic. Biol. Med.* 1999, 26, 463-471.
- Matabudul D., Conway B., Lumley I., Sumar S.: The simultaneous determination of the ionophore antibiotics in animal tissues and eggs by tandem electrospray LC-MS-MS. *Food Chemistry* 2001, 75, 345-354.
- Mitani M., Yamanishi T., Miyazaki Y.: Salinomycin effects on mitochondria ion translocation and respiration. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976, 9, 655-660.
- Muzyczuk-Piekarska A., Kowalska-Pylka H., Cybulski W., Rzeski W.: Ocena cytotoksycznego działania fungicydów o budowie bantzioanilidów. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1124-1128.
- Nicpoń J., Czerw P.: Patogeneza, diagnostyka i terapia zatruc salinomycyną u koni. *Medycyna Wet.* 1995, 51, 659-662.
- Novilla M.: The veterinary importance of the toxic syndrome induced by ionophores. *Vet. Hum. Toxicol.* 1992, 34, 66-70.
- Oehme F., Pickrell J.: An analysis of the chronic oral toxicity of polyether ionophore antibiotics in animals. *Vet. Hum. Toxicol.* 1999, 41, 251-257.
- Oh K., Qian T., Brenner D.: Salicylate enhances necrosis and apoptosis mediated by the mitochondrial permeability transition. *Toxicol. Sci.* 2003, 73, 44-52.
- Park W., Seol J., Kim E., Kang W., Im Y., Jung Ch., Lee Y.: Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *Br. J. Haematol.* 2002, 119, 400-409.
- Radko L., Cybulski W., Wessely-Sponder J., Rzeski W.: Badania cytotoksyczności monenzyny i narazyny w hodowli linii ciągłej hepatocytów szczura. *Medycyna Wet.* 2006, 62, 834-836.
- Żmudzki J.: Zatrucia kokcydiostatykami. *Mat. sesji nauk: Kokcydiostatyki – zakres i bezpieczeństwo stosowania.* Puławy 1997, s. 17-19.
- Żmudzki J., Kozak A., Wiśniewska-Dmytrow H.: Pozostałości lasalocydu w tkankach drobiu. *Życie Wet.* 1994, 69, 242-244.

Adres autora: lek. wet. Lidia Radko, ul. Akademicka 12, 21-950 Lublin; e-mail: lidia@radko.pl