

# Wpływ tlenku cynku na stan histologiczny błony śluzowej jelit tuczników<sup>\*)</sup>

ANNA REKIEL, WOJCIECH BIELECKI\*, JUSTYNA WIĘCEK

Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

\*Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159C, 02-787 Warszawa

Rekiel A., Bielecki W., Więcek J.

## Effect of zinc oxide on the histology of mucosa in fatteners' intestines

### Summary

The aim of the study was to determine the effect of adding an antibiotic or zinc oxide together with the feed on the histological picture as well as on the apoptotic and proliferation activity of enterocytes in the mucus of the small intestine of fatteners. The investigations were carried out on 32 crossbred fatteners. The animals were fed in a two-stage system, with the addition of feed antibiotic (control group – C) or with the 0.1-percent addition of zinc oxide (the first stage of fattening; experimental group – E). Samples of small intestine segments (duodenum, jejunum and ileum) were collected post mortem and secured from 16 randomly chosen animals (8 animals from group E and 8 from C) for histological, histochemical and immuno-histochemical analysis. Staining was conducted using the review method (H-E) and paS-Alcjan. For evaluation of apoptosis and proliferation, the antibodies bax, bcl-x bcl-2 and Ki-67 and PCNA were used. The histological, histochemical and immuno-histochemical evaluation of the mucus of the small intestine of the animals, receiving feed antibiotic or ZnO, showed a comparable influence of the used additives on the morphological traits as well as differentiated the apoptosis and proliferation abilities of the crypt epithelium (cells Ki-67 positive – duodenum and jejunum:  $P \leq 0.05$  K vs D; PCNA positive – duodenum:  $P \leq 0.01$  K vs D). No negative influence of the zinc oxide additive on the mucus of the small intestine in fatteners was found, which indicates the potential possibility of employing it in the first stage of the fattening period.

**Keywords:** fatteners, zinc oxide, small intestine, epithelial cells

Zasadność stosowania w żywieniu rosnących świń różnych dodatków paszowych, w tym tlenku cynku, potwierdzono w badaniach naukowych, chociaż uzyskiwane rezultaty nie zawsze były jednoznaczne (10, 13-15, 20). Wykazano, że dodatki regulują skład mikroflory jelit (11) oraz syntezę i aktywność niektórych enzymów (9), korzystnie wpływają też na system immunologiczny (5). Stosując w żywieniu tuczników dodatek ZnO wykazano, że poziom cynku w surowicy krwi i w mięsie wieprzowym pozostaje w normie (19). Cynk jest niezbędny biologicznie, reguluje funkcjonowanie licznych enzymów i hormonów, uczestniczy w metabolizmie białek, lipidów i węglowodanów. Oddziałuje na mitozę i proliferację komórek, moduluje procesy apoptozy, zmieniając proporcje białek BCL/BAX (cyt. 21). Wyniki badań dotyczące wpływu tlenku cynku na nabłonek jelita cienkiego nie są jednoznaczne. Stosując dodatek ZnO do paszy dla świń nie stwierdzono jego niekorzystnego wpływu na cechy morfometryczne kosmków jelitowych i krypt (20), ale w innych badaniach obserwowano zróżnicowaną aktywność proliferacyjną enterocytów (17). Ze względu na brak jednoznacznych

wyników i ocen, co do przydatności tlenku cynku jako dodatku do paszy dla rosnących zwierząt (5, 9, 14, 16), uzasadnione wydaje się kontynuowanie badań z tego zakresu, wykorzystując do oceny nabłonka jelit różne techniki, w tym histochemiczne i immunohistochemiczne (1, 4, 12, 18).

Celem badań było określenie wpływu antybiotyku i tlenku cynku na obraz histologiczny oraz aktywność apoptotyczną i proliferacyjną enterocytów błony śluzowej jelita cienkiego u tuczników.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono na 32 tucznikach mieszańcach, w których do grupy kontrolnej (K) i doświadczalnej (D) przydzielono po 16 szt. klinicznie zdrowych zwierząt. Utrzymywano je indywidualnie, a przed tuczem odrobaczono. W tuczu dwufazowym (I – od  $21 \pm 0,5$  kg do  $55 \pm 1$  kg, II – od  $55 \pm 1$  kg do  $100 \pm 1$  kg) świniom indywidualnie dawkowano paszę (2). Tuczniaki K otrzymywały w mieszance pełnoporcjowej 5% premiks z dodatkiem antybiotyku flawomycyny (100 mg na 1 kg), a zwierzęta D premiks bez antybiotyku. Tuczniakom doświadczalnym w I fazie tuczu podawano 0,1% dodatek tlenku cynku. Wykonano badania składu chemicznego surowców i mieszanek paszowych (3), określono ich

<sup>\*)</sup> Projekt Nr P06Z 026 25.

wartość pokarmową. Wartość energetyczna 1 kg mieszanki podawanej tucznikom w I i II fazie tuczu wyniosła 12,3 i 12,2 MJ EM/kg (2), a zawartość białka: K – 159 i 141 g/kg, D – 158 i 141 g/kg.

Po zakończeniu tuczu ubito 16 tuczników (po 8 sztuk z grupy). Bezpośrednio po uboju pobrano wycinki z trzech odcinków jelita cienkiego: dwunastnicy (D), jelita czczego (CZ) i jelita biodrowego (B) (5 × 20 mm każdy). Przepłukano je 0,9% roztworem soli fizjologicznej i utrwalono w 10% zbuforowanym roztworze formaliny, a następnie zatopiono w parafinie (Paraplast-Sigma). Bloczki parafinowe krojono na mikrotomie na seryjne skrawki grubości 4 µm. Utrwalone skrawki barwiono standardowo hematoksyliną i eozyną (H-E). Występowanie różnorodnych komórek wyrażono znakiem plus (+), przyjmując: + umiarkowane, ++ liczne, +++ bardzo liczne. Na podobnej zasadzie wprowadzono oznaczenie występowania nacieków, a mianowicie: \* umiarkowane, \*\* obfite, \*\*\* bardzo obfite. Wykonano barwienie histochemiczne (paS-Alcjan) w celu wykrycia mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych. Immunohistochemicznie oznaczano występowanie antygenów bax, bcl-x, bcl-2, PCNA i Ki-67. Do badań diagnostycznych *in situ* apoptozy użyto przeciwciał: Polyclonal Rabbit Anti-Human Bax (bax); Polyclonal Rabbit Anti-Human Bcl-X (bcl-x); Monoclonal Mouse Anti-Human BCL2, Oncoprotein, Clone 124 (bcl-2). Proliferację komórek nabłonka badano metodą dwuetapową – systemem EnVision+, stosując przeciwciała monoklonalne Monoclonal Mouse Anti-Human Ki-67, Clon Ki-S5 (Ki-67) oraz Monoclonal Mouse Anti-Proliferating Cell Nuclear Antygen (PCNA), Clone PC10 (PCNA).

Oceny preparatów dokonano z wykorzystaniem mikroskopu świetlnego BX 50 Olympus, przy powiększeniu 400×.

W preparatach barwionych metodami immunohistochemicznymi określano reakcje dodatnie i ujemne, o charakterze rozproszonym (bax, bcl-x, bcl-2) lub policzalnym (PCNA, Ki-67). Komórki PCNA dodatnie i Ki-67 dodatnie liczono w trzech powtórzeniach, każdorazowo do stu komórek. Wyniki obliczeń zapisywano jako średnią powtórzeń. Podobnie postępowano, obliczając procent komórek kubkowych produkujących kwaśne lub obojętne mukopolisacharydy.

Wyniki opracowano statystycznie, stosując jednoczynnikową analizę wariancji z wykorzystaniem metody najmniejszych kwadratów.

## Wyniki i omówienie

Standardowe barwienie hematoksyliną-eozyną (H-E) umożliwiło wykonanie oceny morfologicznej poszczególnych odcinków jelit tuczników z grupy K i D. W zrębie błony śluzowej dwunastnicy tuczników K występowały rozmaite komórki, w ilościach wyróżniających obecne były komórki plazmatyczne (tab. 1). Stwierdzono obfity naciek komórek jednojądrzastych z dość dużą liczbą plazmocytoz. W zrębie błony śluzowej jelita czczego stwierdzono rozrost łącznotkankowy, w otoczeniu krypt oraz w zrębie kosmków jelitowych występowały liczne włókna łącznotkankowe. Wystąpiły też nacieki komórek jednojądrzastych, ogniskowo z udziałem komórek tucznych. Ocena histologiczna preparatów sporządzonych ze skrawków jelita biodrowego nie wykazywała odchylenia od normy. Stwierdzono nacieki,

**Tab. 1. Ocena histologiczna nacieków komórkowych w błonie śluzowej jelit (barwienie hematoksyliną-eozyną (H-E))**

Barwienie (H-E) / komórki	Odcinek jelita cienkiego					
	dwunastnica		czcze grupa		biodrowe	
	K	D	K	D	K	D
Jednojądrzaste		++**	+++**	++**		++*
Plazmocyty	+++***	++**			+++*	
Histiocyty					++	
Tuczne		+	+	+++	+	+++
Eozynofile					+++	

Objaśnienia: K – grupa kontrolna (flawomycyna); D – grupa doświadczalna (ZnO); obecność komórek: + umiarkowana, ++ liczne, +++ bardzo liczne (mała, średnia, duża); nacieki komórek: \* umiarkowane, \*\* obfite, \*\*\* bardzo obfite

z równomiernym udziałem komórek plazmatycznych. Bardzo licznie występowały eozynofile, obecność histiocytów była znacząca, stwierdzono też obecność pojedynczych komórek tucznych (tab. 1).

Ocena materiału pobranego od tuczników z grupy doświadczalnej (D) wykazała nacieki komórek jednojądrzastych w dwunastnicy (tab. 1). Obserwowano również obfite lub niewielkie nacieki komórkowe, ogniskowo z przewagą komórek plazmatycznych i tucznych. W obrazie zrębu jelita czczego i biodrowego w naciakach komórkowych stwierdzano bardzo duży udział komórek jednojądrzastych ponadto występowały licznie komórki tuczne.

Nie stwierdzono różnic potwierdzonych statystycznie między grupami w udziale komórek kubkowych, wydzielających mukopolisacharydy kwaśne i obojętne w kryptach jelitowych; proporcje między komórkami były porównywalne dla grup (K i D) i odcinków jelit (D, Cz, B). Odsetek komórek kubkowych wydzielających mukopolisacharydy kwaśne w porównaniu do wydzielających mukopolisacharydy obojętne był wysoki (tab. 2). Ich udział w dwunastnicy i jelicie czczym tuczników z obu grup (D i K) oraz w jelicie biodrowym tuczników D był nieco większy niż u tuczników K. W grupie K i D odsetek komórek kubkowych wydzielających mukopolisacharydy obojętne był niewielki w poszczególnych odcinkach jelita; największy stwierdzono w grupie K w jelicie biodrowym (tab. 2). Badania Browna i wsp. (6), w których wykorzystano histochemiczne metody oceny, wykazały, że pod wpływem czynników żywieniowych występują zmiany w jelitach. Obserwowano wzrost liczby komórek kubkowych w kryptach i kosmkach jelitowych oraz zwiększenie wydzielania mucyn. Ponadto stwierdzono brak zmian w proporcji wydzielanych mukopolisacharydów kwaśnych i obojętnych (6). Hedemann i wsp. (9) również stwierdzili, że pod wpływem ZnO podawanego z paszą następuje wzrost ilości mucyn wydzielanych w jelicie. W badaniach na prosiętach Mavromichalis i wsp. (15) wykazali, że ZnO może być stosowany jako promotor wzrostu, a suplementacja diety nie powoduje zmian morfologii błony śluzowej jelit, jednak z uwagi na jego wysoką

Tab. 2. Udział komórek kubkowych w kryptach jelitowych produkujących mukopolisacharydy kwaśne lub obojętne (barwienie paS-Alcjan)

Mukopolisacharydy	Odcinek jelita cienkiego								
	dwunastnica			czcze			biodrowe		
	grupa		SE	grupa		SE	grupa		SE
K	D	K		D	K		D		
Kwaśne	98,83	98,00	0,917	98,17	99,83	0,678	93,00	98,83	3,342
Obojętne	1,17	2,00		1,83	0,17		7,00	1,17	

Objaśnienia: jak w tab. 1.

Tab. 3. Ocena apoptozy enterocytów w kryptach jelitowych (procent reakcji)

Przeciwciało	Odcinek jelita cienkiego											
	dwunastnica				czcze				biodrowe			
	K		D		K		D		K		D	
	Reakcja											
	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
Bax	25	75	25	75	25	75	75	25	75	25	100	0
Bcl-x	0	100	0	100	0	100	25	75	0	100	0	100
Bcl-2	0	100	25	75	25	75	0	100	0	100	0	100

Objaśnienia: + reakcja pozytywna; – reakcja negatywna

biodostępność może być on stosowany przejściowo. Wysoki poziom cynku w diecie powoduje wzrost aktywności rozmaitych enzymów w trzustce i wzrost obszarów wydzielania mucyn w jelicie grubym (9). Ponadto, podając ZnO prosiętom, można uzyskać efekt redukcji biegunek. Uzyskane wyniki nie dały jednak definitywnej odpowiedzi co do cynku jako promotora wzrostu. Uważa się, że istnieje na przyszłość możliwość wykorzystania immunomodulacyjnej roli ZnO (5), chociaż w przeprowadzonych badaniach suplementacja tlenkiem cynku diety stosowanej w odchowcie prosiąt odsadzonych nie wpłynęła na ich wzrost i rozwój. W eksperymencie wykonanym przez Li i wsp. (14) uzyskano istotny wzrost tempa wzrostu i wykorzystania paszy przez prosięta po zastosowaniu wymienionego dodatku. U prosiąt zaobserwowano też korzystny wzrost jelit bezpośrednio po odsadzeniu; zachodził on równocześnie ze wzrostem ekspresji IGF-I w błonie śluzowej jelita cienkiego.

Wykonane wstępne badania *in situ* wykazały przydatność przeciwciał bax, bcl-x i bcl-2 do oceny apoptozy. Stosując do znakowania białek przeciwciała bax, bcl-x i bcl-2 uzyskano zarówno pozytywne reakcje, jak też ich brak (tab. 3). Często obserwowano reakcje pozytywne, dyspersyjne. Apoptoza enterocytów w kryptach jelitowych oceniana na podstawie odsetka reakcji pozytywnych dla bax i bcl-2 była zróżnicowana i dość słabo wyrażona. Odsetek pozytywnych reakcji dla bax

i bcl-2 wahał się w poszczególnych odcinkach jelita: w grupie K wyniósł 25-75%, 0-25%, a w grupie D 25-100%, 0-25%. W przypadku bax był on większy w grupie D vs K w jelicie czczym i biodrowym niż w dwunastnicy.

Bax należy do rodziny białek homologicznych z Bcl-2. Białka Bax i Bcl-2 biorą udział w regulacji procesu apoptozy (18, 23, 24) i są promotorami śmierci komórki. W jądrze występuje antagonistą Bax – Bcl-2. Związany jest on z chromosomami, a poziom jego ekspresji zależy od cyklu komórkowego i jest największy podczas mitozy (24).

Odsetek reakcji pozytywnych przy znakowaniu Ki-S5 i PC10 nie wykazywał w poszczególnych odcinkach jelit regularnych zależności. W grupie D vs K zaznaczyła się przewaga komórek Ki-67 dodatnich w dwunastnicy i w jelicie czczym. Komórki PCNA dodatnie przeważały w grupie K vs D w trzech ocenianych odcinkach jelit (tab. 4). Reakcje pozytywne dla Ki-67 i PCNA były

Tab. 4. Ocena właściwości proliferacyjnych enterocytów w kryptach jelitowych (odsetek reakcji pozytywnych)

Przeciwciało	Odcinek jelita cienkiego								
	dwunastnica			czcze			biodrowe		
	grupa		SE	grupa		SE	grupa		SE
K	D	K		D	K		D		
Ki-S5/ komórki Ki-67 dodatnie	47,58 <sup>a</sup>	61,00 <sup>b</sup>	2,107	50,67 <sup>a</sup>	60,80 <sup>b</sup>	2,018	48,11	48,11	3,266
PC10/ komórki PCNA dodatnie	71,75 <sup>A</sup>	45,83 <sup>B</sup>	3,011	69,00	47,27	3,955	50,92	42,85	3,465

Objaśnienia: A, B – różnica istotna przy  $p \leq 0,01$ ; a, b – różnica istotna przy  $p \leq 0,05$

wyraźnie zaznaczone i policzalne (tab. 4). Między grupami K i D stwierdzono istotne ( $p \leq 0,05$ ) różnice dla komórek Ki-67 dodatnich w dwunastnicy i jelicie czczym oraz istotne ( $p \leq 0,01$ ) dla komórek PCNA dodatnich w dwunastnicy.

W grupie D odsetek reakcji pozytywnych po zastosowaniu przeciwciał Ki-67 był największy w dwunastnicy, nieznacznie mniejszy w jelicie czczym i słabiej wyrażony w jelicie biodrowym. W grupie K największy odsetek komórek Ki-67 dodatnich obserwowano w jelicie czczym, a tylko nieznacznie mniejszy w jelicie biodrowym i dwunastnicy. W grupie D vs K reakcja na przeciwciała Ki-67 była silniej wyrażona w kolejnych odcinkach jelita (D-CZ-B), a na przeciwciała PCNA – słabiej (tab. 4).

Przeciwciała monoklonalne Ki-67 znakuje proliferujące komórki z ekspresją antygenu Ki-67. Przeciwciała to pozwala wykazać obecność antygenu Ki-67 m.in. w komórkach zdrowych. Ekspresja antygenu występuje podczas wszystkich aktywnych faz cyklu komórkowego, do których zalicza się fazy:  $G_1$ , S,  $G_2$  i M, nie występuje natomiast w fazie spoczynkowej, tj.  $G_0$  i w komórkach nieaktywnych. Kiedy komórka wchodzi w stan nieproliferacyjny, antygen jest rozkładany (25).

Przy znakowaniu preparatów przeciwciałem PCNA, w grupie D vs K obserwowano mniej reakcji pozytywnych wskazujących na proliferację. W badanych grupach stwierdzono też mniejszą aktywność proliferacyjną na poziomie krypt w jelicie biodrowym w porównaniu z dwunastnicą i jelitem czczym.

Przeciwciała monoklonalne PCNA umożliwia oznaczanie komórek proliferujących tkanek zdrowych (8), co wykorzystuje się w badaniach diagnostycznych immunocytochemicznych *in vitro*. Ekspresję tego białka obserwuje się w końcówce fazy  $G_1$  i w początkowej fazie S. PCNA spełnia ważną rolę dla życia i śmierci komórek, jest elementem mechanizmu replikacji DNA i naprawy jego uszkodzeń. Brak lub niski poziom czynnościowego PCNA może prowadzić do apoptozy komórki (12, 17).

Stosując suplementację paszy L-glutaminą (7) lub kwasami organicznymi (22) i dokonując oceny histometrycznej i immunohistochemicznej wykazano pozytywny efekt lub brak negatywnego oddziaływania wymienionych dodatków na morfologiczno-funkcjonalne cechy jelit.

### Podsumowanie

Ocena histologiczna, histochemiczna i immunohistochemiczna błony śluzowej jelita cienkiego zwierząt otrzymujących antybiotyków paszowy lub ZnO wykazała porównywalny wpływ stosowanych dodatków na cechy morfologiczne oraz zróżnicowany na apoptozę i zdolności proliferacyjne nabłonka krypt (komórki Ki-67 dodatnie – dwunastnica i jelito czcze:  $p \leq 0,05$  K vs D; PCNA dodatnie – dwunastnica:  $p \leq 0,01$  K vs D). Nie stwierdzono negatywnego oddziaływania dodatku tlenku cynku na błonę śluzową jelita cienkiego tuczników, co wskazuje na potencjalną możliwość jego stosowania w I fazie tuczu. Podjęcie decyzji w tej kwestii wymaga jednak kontynuacji badań na szerszą skalę.

### Piśmiennictwo

1. Adams J. M., Cory S.: The bcl-2 protein family: Arbiters of cell survival. *Science* 1998, 281, 1322-1326.
2. Anon.: Normy Żywienia Świń. IFiZZ PAN. Omnitech-Press, Warszawa 1993.
3. Anon.: Official Methods for Analysis of the Associated of Official Analytical Chemists. AOAC, Washington, DC 1990.
4. Boise L. H., Gonzalez-Garcia M., Postema C. E., Ding L., Lindsten T., Turka L. A., Mao X., Nunez G., Thompson C. B.: bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 1993, 74, 597-608.
5. Broom L. J., Miller H. M., Kerr K. G., Knapp J. S.: Effect of zinc oxide and *Enterococcus faecium* SF68 dietary supplementation on the performance, intestinal microbiota and immune status of weaned piglets. *Res. Vet. Sci.* 2006, 80, 45-54.
6. Brown P. J., Miller B. G., Stokes C. R., Blazquez N. B., Bourne F. J.: Histochemistry of mucins of pig intestinal secretory epithelial cells before and after weaning. *J. Comp. Pathol.* 1988, 98, 313-323.
7. Domeneghini C., Di Giancamillo A., Savoini G., Paratte R., Bontempo V., Dell'Orto V.: Structural patterns of swine ileal mucosa following L-glutamine and nucleotide administration during the weaning period. An histochemical and histometrical study. *Histol. Histopathol.* 2004, 19, 49-58.
8. Hall P. A., Levison D. A., Woods A. L., Yu C. C.-W., Kellock D. B., Watkins J. A., Barnes D. M., Gillett C. E., Camplejohn R., Dover R., Waseem N. H., Lane D. P.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: An index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.* 1990, 162, 285-294.
9. Hedemann M. S., Jensen B. B., Poulsen H. D.: Influence of dietary zinc and copper on digestive enzyme activity and intestinal morphology in weaned pigs. *J. Anim. Sci.* 2006, 84, 3310-3320.
10. Jansen-Waern M., Melin L., Lindberg R., Joannisson A., Petersson L., Wallgren P.: Dietary zinc oxide in weaned pigs-effects on performance, tissue concentrations, morphology, neutrophil functions and faecal microflora. *Res. Vet. Sci.* 1998, 64, 225-231.
11. Katouli M., Melin L., Jensen-Waern M., Wallgren P., Moliby R.: The effect of zinc oxide supplementation on the stability of the intestinal flora with special reference to composition of coliforms in weaned pigs. *J. Appl. Microbiol.* 1999, 87, 564-573.
12. Kelman Z.: PCNA: structure, functions and interactions [review]. *Oncogene* 1997, 14, 629-640.
13. Li B., van Kessel A. G., Caine W. R., Huang S. X., Kirkwood R. N.: Small intestinal morphology and bacterial populations in ileal digesta and faces of newly weaned pigs receiving a high dietary level of zinc oxide. *Can. J. Anim. Sci.* 2001, 81, 511-516.
14. Li X., Yin J., Li D., Chen X., Zang J., Zhou X.: Dietary supplementation with zinc oxide increases Igf-I and Igf-I receptor gene expression in the small intestine of weaning piglets. *J. Nutr.* 2006, 136, 1786-1791.
15. Mavromichalis I., Peter C. M., Parr T. M., Ganessunker D., Baker D. H.: Growth-promoting efficacy in young pigs of two sources of zinc oxide having either a high or a low bioavailability of zinc. *J. Anim. Sci.* 2000, 78, 2896-2902.
16. Owusu-Asiedu A., Nyachoti C. M., Marquardt R. R.: Response of early-weaned pigs to an enterotoxigenic *Escherichia coli* (K88) challenge when fed diets containing spray-dried porcine plasma or pea protein isolate plus egg yolk antibody, zinc oxide, fumaric acid, or antibiotic. *J. Anim. Sci.* 2003, 81, 1790-1798.
17. Paunesku T., Mittal S., Proctić M., Oryhon J., Korolev S. V., Joachimiak A., Woloschak G. E.: Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome. *Int. J. Radiat. Biol.* 2001, 77, 1007-1021.
18. Reed J. C.: Mini-review: Bcl-2 and the regulation on programmed cell death. *J. Cell Biol.* 1994, 124, 1-6.
19. Rekiel A.: Wpływ podania rosnącym świniom cynku w mieszankach na jego zawartość w surowicy krwi i mięsie wieprzowym. *Żyw. Człow. Metab.* 32, supl. 1, 513-519.
20. Rekiel A., Cichowicz M., Kozłowski W., Batorska M.: The influence of antibiotic, probiotic or zinc oxide addition on morphometric indices of pig intestines. *Ann. Anim. Sci.* 2003, Supl. 2, 123-126.
21. Rekiel A., Więcek J.: Biochemiczne wskaźniki surowicy krwi tuczników żywionych mieszanką z dodatkiem tlenku cynku. *Rocz. Nauk. Pol. Tow. Zoot.* 2005, 1, 115-121.
22. Sakata T., Adachi M., Hashida M., Sato N., Kojima T.: Effect of n-butyric acid on epithelial cell proliferation of pig colonic mucosa in short-term culture. *D. Tierärztl. Wschr.* 1995, 102, 163-164.
23. Sato T., Hanada M., Bodrug S., Irie S., Iwama N., Boise L. H., Thompson C. B., Golemis E., Fong L., Wang H. G., Reed J. C.: Interactions among members of the Bcl-2 protein family analyzed with a yeast two-hybrid system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 9238-9242.
24. Schandl C. A., Li S., Re C. G., Fan W., Willingham M. C.: Mitotic chromosomal Bcl-2: I. Stable expression throughout the cell cycle and association with isolated chromosomes. *J. Histochem. Cytochem.* 1999, 47, 139-149.
25. Scholzen T., Gerdes J.: The Ki-67 protein: from the know and the unknown [review]. *J. Cell Physiol.* 2000, 182, 311-322.

Adres autora: dr hab. Anna Rekiel, prof. SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: anna\_rekiel@sggw.pl