

Znaczenie diagnostyczne wybranych wyników laboratoryjnych mikotoksykozy zearalenonowej zwierząt^{*)}

MAGDALENA GAJĘCKA, ŁUKASZ ZIELONKA, EWA JAKIMIUK, MICHAŁ DĄBROWSKI,
KAZIMIERZ OBREMSKI, GRZEGORZ GORLO, MAGDALENA MRÓZ, MACIEJ GAJĘCKI

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM,
ul. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn

Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Dąbrowski M., Obremski K., Gorlo G., Mróz M., Gajęcki M.

Diagnostic significance of selected analytical indicators of zearalenone mycotoxicosis in animals

Summary

Mycotoxicosis has long been studied in humans and animals. Zearalenone-induced mycotoxicosis poses a growing problem in companion animals and livestock. The objective of this study was to determine whether intoxication with low doses of zearalenone (ZEA) and its biotransformation in selected animal species affects hematological and serum biochemical indices, as well as endocrine, intracrine and immunohistochemical parameters.

Materials and Methods. Experiment I was performed on 36 gilts with a body weight of ± 20 kg. Half of the animals (18 gilts) were administered ZEA at a daily dose of 40 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW, and the remaining gilts were the placebo group. The experiment lasted 42 days. The animals were slaughtered at the end of the experiment (day 42), and samples were collected for laboratory analyses. Experiment II was performed on 30 clinically healthy pre-pubertal beagle bitches aged 70 days, with the initial body weight of ± 8 kg. The dogs were randomly divided into two experimental groups (EI and EII) and a control group (C). The experimental groups were administered per os ZEA doses of 50 and 75 $\mu\text{g}/\text{kg}$ BW, respectively, for 42 days. The control group bitches were administered placebo. The animals were subjected to ovariectomy at the end of the experiment.

Results and Discussion. The type of cell death induced by ZEA was very difficult to define in both groups of animals. Cell apoptosis and/or necrosis is determined by the cell's energy resources, which reflect the level of mitochondrial metabolic activity. ZEA-induced damage of the cell membrane probably reduced the mitochondrial membrane potential. The above led to a decrease in ATP levels, which play an important role in the cell death process. In the presence of a toxic substance, such as ZEA, cell apoptosis and/or necrosis can be induced by the same factor as part of the hormetic response. The death of the cells studied here was induced by excessive Ca^{2+} levels in the mitochondria, mitochondrial dysfunction and a decrease or loss of mitochondrial metabolic activity in oocytes, follicular cells and interstitial cells in the ovaries of experimental bitches and gilts. Low doses of ZEA reduced the number of ER β receptors, the only receptors in the ovaries, which activated epigenetic modification mechanisms and inhibited ovarian development. The increase in E2 concentrations was proportional to the degree of intoxication, which resulted from specific enzymatic regulation in the presence of ZEA as a competitive substrate that modulates the activity of enzymes participating in estrogen biosynthesis at the pre-receptor level and very low concentrations of α -zearalenol due to slow biotransformation of ZEA. Hyperestrogenism was observed, and the hormetic threshold dose level was clearly exceeded in the experimental groups. No changes were found in the hematological and serum biochemical parameters of the gilts and bitches.

Keywords: low-dose zearalenone mycotoxicosis, gilts, pre-pubertal bitches, laboratory diagnostics

Dla większości substancji chemicznych ogólnie jest przyjęte, że mają one dawkę progową, poniżej której

^{*)} Praca wykonana w ramach projektów badawczych nr N N308 242635 oraz NR12-0080-10/2010 finansowanych przez Ministerstwo Nauki i Informatyzacji oraz Narodowe Centrum Badań i Rozwoju w Polsce.

substancja ta nie działa niekorzystnie na organizm, jednakże w ostatnich latach klasyczny monotoniczny/liniowy paradygmat dawka–odpowiedź jest podważany przez tak zwaną „hipotezę niskiej dawki”. Zgodnie z nią, substancje czynne hormonalnie pobierane

w małych wartościach wywołują „efekt niskiej dawki” w zakresie typowego narażenia organizmów żywych, co może mieć miejsce również przy dawce niemonotonicznej, z tym, że wówczas należy je tłumaczyć z perspektywy zjawiska hormezy. Nieliniowa zależność między dawką a skutkiem nie pozwala na bezpośrednią ekstrapolację efektu (objawów) z wysokiej dawki na niską dawkę. To z kolei kwestionuje kluczowe założenia wartości progowej, co w efekcie stwarza sytuacje uciążliwe do oceny ryzyka dla wielu substancji niepożądanych, a wśród nich mikotoksyn, które są przyczynkiem wielu stanów patologicznych u zwierząt.

Spośród mikotoksyn w ostatnim okresie coraz większe zainteresowanie wzbudza zearalenon (ZEA) z racji, że badania nad mechanizmami jego toksyczności oraz jego potencjalnych zagrożeń dla zwierząt i środowiska dokumentują, że nawet niewielkie dawki (w wartościach NOAEL) powodują straty produkcyjne u zwierząt gospodarskich lub zaburzeń funkcjonalnych układu rozrodczego u zwierząt gospodarskich i towarzyszących z racji swej aktywności estrogenopodobnej. Z drugiej strony, należałoby sobie uświadomić, że kluczowym zadaniem staje się zrozumienie przebiegu procesów toksycznych, ponieważ procesy biotransformacji mogą prowadzić do zwiększenia jego toksyczności (α -zearalenol) lub chronić organizm przez szybkie przetwarzanie ZEA do pochodnych obojętnych (β -zearalenol), które mogą być łatwo wyeliminowane.

Zearalenon (ZEA) jest mikotoksyną produkowaną przez wiele gatunków grzybów pleśniowych z rodziny *Fusarium*, a szczególnie przez *F. graminearum*. Najczęściej jego obecność stwierdza się w kukurydzy, ale spotyka się go również w ziarniakach zbóż (pszenicy, jęczmienia, sorgo czy żyta) produkowanych w różnych częściach świata. Obecny bywa w ziarniakach, które dojrzewały i/lub były zbierane w niesprzyjających warunkach i/lub były źle przechowywane (5, 19).

ZEA jest szybko i całkowicie wchłaniany z przewodu pokarmowego ssaków. Proces glukuronizacji ZEA w jelicie cienkim i wątrobie znacząco zmniejsza koncentrację wolnego macierzystego ZEA (receptorowo aktywnego), który dostaje się do układu krążenia. Z kolei enzymatyczna redukcja ZEA jest przyczynkiem produkcji α -zearalenolu (α -ZOL), który ma silniejsze powinowactwo wobec receptorów estrogenowych niż substancja macierzysta (2, 17). Toksyczność ZEA i jego głównych metabolitów dowodzi, że aktywność estrogenowa jest najważniejszą formą ich patologicznego działania (5, 8). Wśród zwierząt domowych i towarzyszących loszki i suki niedojrzałe płciowo są najbardziej wrażliwe na obecność ZEA i jego metabolitów w paszy lub karmie.

Część aspektów poruszonych w niniejszym opracowaniu nie była dotychczas badana w odniesieniu do niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej, a je-

żeli, to były opisywane jednostkowo (3), dlatego w opracowaniu wobec niektórych uzyskanych wyników jest prowadzona ekstrapolacja na temat tego rodzaju przypadłości. Celem badań była ocena, czy niskodawkowa intoksykacja ZEA i jego biotransformacja w organizmie wybranych gatunków zwierząt ma wpływ na określone wskaźniki hematologiczne, biochemiczne surowicy krwi, endokrynne, intrakrynne i immunohistochemiczne.

Materiał i metody

W doświadczeniu I wykorzystanych zostało 36 loszek o masie ciała \pm 20 kg. Połowię z nich podawano ZEA w dawce 40 μ g/kg mc/dzień – 18 zwierzętom; pozostałym podawano placebo. Eksperyment trwał 42 dni. Eutanazję wykonywano w 42. dniu doświadczenia oraz pobierano próbki do badań laboratoryjnych. Doświadczenie II zostało przeprowadzone na 30 klinicznie zdrowych niedojrzałych sukach rasy beagle o początkowej m.c. \pm 8 kg w wieku 70 dni, które podzielono losowo na 2 grupy doświadczalne (EI i EII) i grupę kontrolną C. Grupy E otrzymywały, odpowiednio, 50 i 75 μ g ZEA/kg m.c., *per os* przez okres 42 dni; grupa C otrzymywała placebo. Na zakończenie doświadczenia zwierzęta poddano owariohisterektomii.

Badania hematologiczne wykonano za pomocą analizatora hematologicznego (Medonic) wg metodyki zalecanej przez producenta. Do badań biochemicznych surowicy krwi wykorzystano metodę kinetyczną za pomocą aparatu EPOLL-20.

Toksykologiczne wskaźniki endokrynne oznaczono, stosując łączne techniki separacji z użyciem kolumniek powinowactwa immunologicznego (Zearala-TestTM, G1012, VICAM, Watertown, USA). Metodykę immunohistochemiczną wykorzystano do oznaczenia obecności antygenu PCNA w jądrach komórkowych za pomocą przeciwciała monoklonalnego, mysiego, anti-PCNA (Dako). Metodą TUNEL oznaczono indukcję apoptozy w hodowlach komórek ziarnistych – ApoAlert DNA Fragmentation Assay Kit (Clontech). Wskaźniki o aktywności intrakrynnej oznaczono na drodze inkubacji z przeciwciałem pierwotnym przeciwko HSD – wybarwienie preparatu wykonano przy pomocy reakcji barwnej DAB.

Wyniki i omówienie

Technika TUNEL. Warunkiem istnienia i funkcjonowania organizmów wielokomórkowych jest utrzymywanie precyzyjnej kontroli liczby komórek aktywnych biologicznie. Jest to zapewnione dzięki zachowaniu równowagi między czterema procesami: podziałem, różnicowaniem, dojrzewaniem i śmiercią komórek. Każdy z nich może ulec dysfunkcji lub być zainicjowany przez inne niż fizjologiczne czynniki. Jednym z nich są mikotoksyny, które działają wielokierunkowo na żywą komórkę. Zaburzeniom może ulegać szereg szlaków metabolicznych, w tym szlak produkcji związków wysokoenergetycznych, co jest czynnikiem inicjującym końcowy proces, czyli obumieranie (11). W czasie tego procesu jednym z etapów jest wpływ metabolitów mikotoksyn, w sposób

pośredni, na destrukcję kwasów nukleinowych (9). Stopień obumierania komórek może być określany przy użyciu techniki TUNEL (14). Metoda ta pozwoliła na stwierdzenie obecności komórek jajnika z typowymi cechami apoptozy, także tych we wczesnych stadiach samobójczej śmierci, które nie wykazują jeszcze widocznych zmian morfologicznych. W większości opracowań występowanie komórek apoptotycznych wyrażano pod postacią wskaźnika apoptotycznego (Apoptotic Index – AI), określającego procentowy udział komórek apoptotycznych występujących wśród 1000 komórek badanych. Z badań własnych wynika, że mediana AI dla 30 suk wyniosła 13, a dla 36 loszek – 10. Z kolei w odniesieniu do poszczególnych grup eksperymentalnych stwierdzano dużo wyższą medianę AI u loszek (12,42) oraz u suk w grupie EI (13,45) i dwukrotnie wyższą w grupie EII (17,84) w porównaniu z grupą C (8,59 dla suk i 7,02 dla loszek) lub z ogólną medianą. Z powodu braku stosownych danych piśmiennictwa pozwalających na odniesienie uzyskanych wyników do wyników innych badań można jedynie przypuszczać, że są to wartości wysokie, sugerujące istotny wzrost procesów apoptotycznych w intoksykowanych komórkach zwierząt dojrzewających. Wartości te są również wysokie w przypadku porównania z wynikami uzyskiwanymi w niedojrzałych oocytach u bydła, a wynoszącymi 7 (10). Nieco inny charakter mają otrzymane wyniki własne w odniesieniu do oocytów zwierząt dojrzewających, u których mediany dochodzą do 23. Należy pamiętać, że wartości te wzrastają wraz z wiekiem samicy, a przecież w przedstawionych eksperymentach własnych badano jajniki loszek i suk dojrzewających, co sugeruje, że fizjologicznie AI powinien być niewielki.

Metoda PCNA. Jako że procesy ewentualnego obumierania należy udokumentować kilkoma wskaźnikami, wykonano również ocenę zjawiska proliferacji, w jajniku z użyciem metody PCNA. Wykorzystuje się ją, ponieważ jednym z mechanizmów utrzymujących homeostazę organizmu obok apoptozy w sposób naturalny jest zjawisko proliferacji komórek zachodzące na drodze mitozy. Wskaźnik ekspresji PCNA (PI) określa dokładniej odsetek wybarwionych jąder komórkowych. Wskaźnik PCNA wymaga również przejrzenia większej liczby komórek jajnika, ponieważ do jego oceny konieczne było obejrzenie średnio 10 pól widzenia. Ocena wielu pól widzenia jest szczególnie istotna w odniesieniu do tkanek z nierównomiernym rozmieszczeniem dodatkowo wybarwionych jąder komórkowych. Białko PCNA charakteryzuje się dużą różnorodnością pomiędzy różnymi fragmentami tej samej tkanki jajnika, sprawiając, że ostateczna ocena odsetka wybarwionych jąder komórkowych ściśle zależy od wielkości ocenianego preparatu oraz od liczby obejrzanego pól widzenia (1).

W obu grupach doświadczalnych obserwowano słabiej wyrażoną aktywność proliferacyjną badanych pęcherzyków jajnikowych. Dowodem jest wartość ogól-

na mediany PI (która wyniosła dla suk 25,49, a dla loszek 67,51). Wartości mediany PI dla poszczególnych grup (dla suk EI = 22,79; EII = 18,20; C = 35,49, a dla loszek 62,16) dokumentują również fakt, że w wyniku trwającej niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej procesy proliferacyjne uległy silnemu spowolnieniu (hipostymulacji) w oocytach pęcherzyków pierwotnych i wzrastających w porównaniu do grupy C. W pęcherzykach atrezyjnych tego rodzaju różnic w aktywności proliferacyjnej nie stwierdzano.

Z badań wykonanych w Katedrze, lecz jeszcze nieopublikowanych wynika, że proces apoptozy uruchamiany w komórkach jajnika podczas mikotoksykozy zearalenonowej u suk był typu wewnątrzkomórkowego i rozpoczynał się w mitochondriach. Obecność ZEA lub jego metabolitu α -zearalenolu wywoływała stan hyperestrogenizmu, co powodowało na poziomie komórki wzrost poziomu Ca^{2+} w mitochondriach. Sugeruje to, że ma miejsce stymulowany estrogenami wzrost stężenia komórkowego 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 Ca^{2+} . Zwiększony napływ jonów wapnia zmusza mitochondria do ich magazynowania w celu utrzymania homeostazy w cytoplazmie. W momencie przeładowania mitochondriów jonami wapnia następuje zahamowanie fosforylacji oksydacyjnej, co może prowadzić do śmierci komórki. Mechanizm działania ZEA prawdopodobnie doprowadził w dalszej konsekwencji do szybkiego zubożenia wewnątrzkomórkowych zasobów energetycznych (ATP), zaś uszkodzenie struktur mitochondrialnych doprowadziło do śmierci energetycznej komórki (6).

Receptory estrogenowe i dehydrogenazy hydrokysteroidowe (HSD). ZEA i jego metabolity to związki niesteroidowe posiadające zdolność do wiązania się z receptorami estrogenowymi (ERs) na drodze współzawodnictwa z 17β -estradiolem (E_2) o specyficzne miejsca wiązania na ERs. ZEA po utworzeniu kompleksu z receptorem inicjuje w nim zmiany konformacyjne prowadzące do wiązania z ERE (oestrogen-responsive elements) na DNA. Konsekwencją tego jest agonistyczno/antagonistyczna transkrypcja genów wrażliwych na estrogeny. Równowaga ta zależy głównie od typu ER badanej tkanki i względnego poziomu ligandów lub receptorów (15). Ligandy wiążące domeny $ER\alpha$ i $ER\beta$ mają bardzo podobną strukturę i w związku z tym wiele ligandów łączy się z nimi z równoważnym powinowactwem. Powinowactwo wiązania ZEA do ER w docelowych tkankach i komórkach stanowi 1-10% w porównaniu z E_2 (5, 17). Aktywność ZEA i α -ZOL w tkankach docelowych zależy także od typu ER.

Wykorzystując określoną wiedzę podstawową/fizjologiczną, dotyczącą współzależności między endogennymi związkami sterydowymi a receptorami estro-

genowymi u suk i loszek, można dokonać próby oceny wpływu ZEA na obecność określonego typu ERs w jajniku.

Występowanie ER β u suk i loszek wykazano na każdym etapie rozwoju pęcherzyka jajnikowego, od pęcherzyka pierwotnego do pęcherzyka owulacyjnego, oraz w każdej fazie rozwoju ciała żółtego, natomiast obecność ER α stwierdzano jedynie w dużych, przedowulacyjnych pęcherzykach oraz we wczesnym stadium rozwoju ciała żółtego sów (16). Podobne spostrzeżenia dotyczące ekspresji ER α mRNA u suk tylko w fazie lutealnej w jajniku przedstawili w swej pracy Hatoya i wsp. (7).

Przy ocenie stwierdzonej sytuacji ERs w jajnikach suk i loszek (zmniejszenie ich udziału w obu grupach doświadczalnych) podczas mikotoksykozy zearalenonowej nie należy zapominać że ZEA jest czynnikiem zaburzającym funkcje endokryjne (endocrine disrupter). Fitoestrogeny, a w tym i ZEA z reguły działają wielokierunkowo (18). Między innymi mogą one modulować aktywność enzymów biorących udział w procesie biosyntezy estrogenów, takich jak: aromatazy, sulfatazy, sulfotransferazy czy dehydrogenazy hydroksysteroidowe (HSD), jak np. 3 β -HSD i 17 β -HSD na poziomie prereceptorowym nazwano enzymatycznymi regulatorami prereceptorowymi (12). Enzymy te katalizują przebieg reakcji nie tylko w końcowym etapie biosyntezy androgenów, estrogenów czy progesteronu, lecz także przekształcają aktywność receptorów ketosteroidowych w formę mniej aktywną, co stanowi o jednym ze sposobów regulacji aktywności hormonalnej na poziomie prereceptorowym (12). HSDs spełniają swą aktywność miejscowo i stereospecyficznie wobec podstawników ketonowych i hydroksylowych w centrum steroidowym i łańcuchach bocznych, np. 17 β -HSD katalizuje zarówno redukcję estronu (słabego estrogenu), pozyskując 17 β -estradiol (silny estrogen), jak również katalizuje reakcję odwrotną (12). W ten sposób enzym ten jest przełącznikiem molekularnym regulującym dostępność do ligandów receptorów estrogenowych (ER).

Ponieważ w przedstawionym doświadczeniu zwierzęta były intoksykowane przez długi czas, 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) w odniesieniu do ilości pobranego ZEA ma miejsce zachwianie równowagi procesu detoksykacji pomiędzy I fazą (hipostymulacja) a II fazą i następuje przenikanie do organizmu metabolitów typu α -ZOL (od 1 do 2 ng/ μ l – dane niepublikowane) i β -ZOL (0 ng/ μ l – dane niepublikowane), co potwierdzają sugestie innych autorów (13). Metabolity te mogą powodować znaczne zmiany aktywności enzymów biorących udział w procesie sterydogenezy lub regulacji hormonalnej na poziomie przedreceptorowym zależnie od dawki substratu (ZEA i jego metabolitów

– przy tych ostatnich efekt jest odwrotnie proporcjonalny). Wyniki badań własnych (4) dowodzą, że przy dawce NOAEL (grupa I) nie stwierdzono statystycznego wzrostu poziomu mRNA dla genu 3 β -HSD i CPSsc w odniesieniu do grupy EI, czyli organizm zwierząt radził sobie z tą nieznaczną intoksykacją ZEA (swego rodzaju adaptacja wobec zaistniałej sytuacji). W grupie II, w której podawano wyższe wartości ZEA (150% wartości NOAEL) suk, stwierdzono jednak statystycznie istotny ($p = 0,016$) wzrost poziomu mRNA, lecz tylko dla 3 β -HSD, co ma duże znaczenie dla podtrzymania procesów sterydogenezy, a nie dla jej wywołania oraz/lub jako wynik nagromadzenia substratu, jakim jest ZEA (2). Towarzyszył temu siedmiokrotny wzrost liczby transkryptów mRNA, ale tylko dla 3 β -HSD przy równoczesnym dwukrotnym, lecz statystycznie nieistotnym wzroście poziomu mRNA dla genu CYPsc na granicy istotności statystycznej ($p = 0,076$). Tego rodzaju badań dla 17 β -HSD nie wykonano.

Równolegle wykonano badania oceniające lokalizację HSD w immunoreaktywnych komórkach jajników loszek i suk. Stwierdzono, że przy 3 β -HSD ma miejsce adaptacja wobec intoksykacji niskimi dawkami ZEA lub jest słabo wyrażona reakcja na obecność substancji niepożądaną we wszystkich badanych komórkach. W przypadku 17 β -HSD stwierdzono w grupie EII wyraźny wzrost aktywności (wybarwienia) w pęcherzykach wzrastających (drugorzędowych) czy dojrzewających (trzeciorzędowych) oraz w pęcherzykach atrezyjnych i w komórkach warstwy tekalnej w porównaniu do grupy C i grupy EI.

Badania hematologiczne i biochemiczne surowicy krwi. W uzyskanych wynikach badań hematologicznych i biochemicznych surowicy krwi tak u loszek, jak i u suk nie stwierdzono jakichkolwiek różnic statystycznych. Należy przypuszczać, że niskie dawki ZEA pobierane przez dłuższy czas przyczyniają się do uruchomienia procesów adaptacyjnych nie pozwalających na powstanie jakichkolwiek procesów powodujących dysfunkcje organizmu przynajmniej na poziomie badań ogólnych, korzystając z próbek pobieranych z tkanek peryferyjnych.

Podsumowanie

W dostępnym piśmiennictwie brak jest danych dotyczących łącznej oceny wpływu wszystkich analizowanych w przedstawionym opracowaniu wskaźników podczas długoterminowej niskodawkowej intoksykacji zearalenonem niedojrzałych płciowo suk i loszek. Uzyskane wyniki badań własnych wskazują, że wartości AI i PI jajnika dostarczają istotnych informacji, iż obecność ZEA w dawkach bardzo niskich w karmie przemysłowej dla psów i karmie pełnoporcjowej dla loszek jest przyczyną wzmożenia procesu apoptozy oraz spowolnienia procesów proliferacyjnych w pęcherzykach pierwotnych i rozwijających się, zarówno w oocytach, jak i w komórkach pęcherzykowych. Na-

stępstwem powyższego jest wystąpienie hipostymulacji w pęcherzykach jajnikowych suk i loszek. Stopień hipostymulacji jak i atrezji jest wprost proporcjonalny do wielkości dawki ZEA.

Przedstawione wyniki mogą również sugerować, że brak receptorów typu ER α oraz obecność tylko receptorów typu ER β w jajnikach suk i loszek grupy kontrolnej © powoduje przytłumienie koncentracji 17 β -estradiolu. 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 β , ponieważ receptor ten ma zdolność łączenia się bezpośrednio z miejscem wybiórczo wrażliwym w ERE na DNA, co miałoby istotne znaczenie dla rozwoju organizmu jako takiego, czyli rozwój komórek jajnika może mieć miejsce mimo bardzo niskiej fizjologicznej koncentracji E $_2$. Dodatkowa obecność w organizmie ZEA powoduje natomiast spadek udziału tych receptorów przy widocznym wzroście aktywności 3 β - i 17 β -HSD jako przełączników molekularnych, czyli ZEA i jego metabolity działają jako stimulatory tych enzymów, przez co pełnią rolę zwierzchnią nawet podczas stosowania dawek NOAEL, a więc w trakcie hormezy.

Kolejną, istotną funkcją ERs jest ich zdolność wpływania na mechanizmy modyfikacji epigenetycznej. Proces polegający na modyfikacji aktywności genów w jądrze komórkowym, pozwalający na „cofnięcie” komórki/komórek do wcześniejszego etapu rozwoju. W przypadku ERs polega to na wyhamowaniu procesów ich ekspresji przez promotorów, jakimi są odwracalna metylacja i acetylacja histonów.

Analiza powyższych wskaźników w jajniku niedojrzałych płciowo suk i loszek stanowi ważny aspekt poznawczy i może być pomocna w zrozumieniu niektórych mechanizmów zachodzących w jajnikach, a jej wyniki – wykorzystane dla celów diagnostycznych.

Piśmiennictwo

1. Dworakowska D.: Apoptotic index and selected cell cycle regulators in non-small cell lung cancer. *Ann. Acad. Med. Gedanensis* 2005, 35, 1-112.
2. Gajęcka M., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K., Gajęcki M.: The biotransformation of chosen mycotoxins. *Pol. J. Vet. Sci.* 2009, 12, 293-303.
3. Gajęcka M., Obremski K., Jakimiuk E., Skorska-Wyszyńska E., Zielonka Ł., Gajęcki M.: Histopathological examination of ovaries in bitches after experimental zearalenone micotoxicosis. *Pol. J. Vet. Sci.* 2008, 11, 363-366.
4. Gajęcka M., Woźny M., Brzuzan P., Zielonka Ł., Gajęcki M.: Expression of CYPsc and 3 β -HSD mRNA in bitches ovary after long-term exposure to zearalenone. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2011, 55, 777-780.
5. Gajęcki M., Gajęcka M., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K.: Zearalenone – undesirable substance, [w:] Mahendra Rai, Ajit Varma (Eds.): *Mycotoxins in Food, Feed and Bioweapons*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2010, 131-144.
6. Gunter T. E., Sheu S.-S.: Characteristics and possible functions of mitochondrial Ca $^{2+}$ transport mechanisms. *BBA-Bioenergetics* 2009, 1787, 1291-1308.
7. Hatoya S., Torii R., Kumagai D., Sugiura K., Kawate N., Tamada H., Sawada T., Inaba T.: Expression of estrogen receptor a and b genes in the mediobasal hypothalamus, pituitary and ovary during the canine estrous cycle. *Neurosci. Lett.* 2003, 347, 131-135.
8. Kuciel-Lisieska G., Obremski K., Stelmachów J., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Gajęcki M.: The presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in a mammary gland. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, 52, 671-674.
9. Łabędzka K., Grzanka A., Izdebska M.: Mitochondria and cell health. *Postepy Hig. Med. Dosw.* (online) 2006, 60, 439-446.
10. Matwee C., Betts D. H., King W. A.: Apoptosis in the early bovine embryo. *Zygote* 2000, 8, 57-68.
11. Moreira P. I., Custódio J. B. A., Nunes E., Oliveira P. J., Moreno A., Seica R., Oliveira C. R., Santos M. S.: Mitochondria from distinct tissues are differently affected by 17 β -estradiol and tamoxifen. *J. Steroid Biochem.* 2011, 123, 8-16.
12. Penning T. M.: Human hydroxysteroid dehydrogenases and pre-receptor regulation: Insights into inhibitor design and evaluation. *J. Steroid Biochem.* 2011, 125, 46-56.
13. Plewka A.: The metabolism of xenobiotics in alimentary system with special regard to the role of large intestine. *Proc. VII International Scientific Conference: Veterinary Feed Hygiene – The Effects of Mycotoxins on Gastrointestinal Function.* 23-24 September 2011, Olsztyn, Poland, s. 60-69.
14. Scotti L., Irueta G., Abramovich D., Tesone M., Parborell F.: Administration of a gonadotropin-releasing hormone agonist affects corpus luteum vascular stability and development and induces luteal apoptosis in a rat model of ovarian hyperstimulation syndrome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2011, 335, 116-125.
15. Singh M. N., Stringfellow H. F., Paraskevaidis E., Martin-Hirsch P. L., Martin F. L.: Tamoxifen: important considerations of a multifunctional compound with organ-specific properties. *Cancer Treat. Rev.* 2007, 33, 91-100.
16. Słomczyńska M.: The dynamic of the steroid hormone receptors distribution in the ovary. *Post. Biol. Kom.* 2002, 29, 27-46.
17. Takemura H., Joong-Youn S., Kazutoshi S., Airo T., Bao T. Z., Kayoko S.: Characterization of the estrogenic activities of zearalenone and zeranol in vivo and in vitro. *J. Steroid Biochem.* 2007, 103, 170-177.
18. Wąsowicz K., Chmielewska M., Łosiewicz K.: Estrogen receptors – morphology, physiology, pathology. *Proc. VII International Scientific Conference: Veterinary Feed Hygiene – The Effects of Mycotoxins on Gastrointestinal Function.* 23-24 September 2011, Olsztyn, Poland, s. 56-59.
19. Zinedine A., Soriano J. M., Moltó J. C., Mañes J.: Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. *Food Chem. Toxicol.* 2007, 45, 1-18.

Adres autora: dr Magdalena Gajęcka, Katedra Prewencji Weterynaryjnej, Wydział Medycyny Wet., ul. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn; e-mail: hignasz@uwm.edu.pl