Postępy w naukach weterynaryjnych i biotechnologii zwierząt

Postępy w naukach weterynaryjnych i biotechnologii zwierząt

Redakcja:
Alicja Danielewska
Kamil Maciąg

Lublin 2020

Wydawnictwo Naukowe TYGIEL składa serdeczne podziękowania dla zespołu Recenzentów za zaangażowanie w dokonane recenzje oraz merytoryczne wskazówki dla Autorów.

Recenzentami niniejszej monografii byli:

prof. dr hab. Marek Babicz
prof. dr hab. Renata Urban-Chmiel
dr hab. Izabela Krakowska prof. UR
dr hab. inż. Edyta Molik, prof.UR
dr hab. Tomasz Schwarz, prof. UR
dr hab. Dorota Nieoczym
dr n. farm. Anna Biernasiuk
dr Agnieszka Kuźniar

Wszystkie opublikowane rozdziały otrzymały pozytywne recenzje.

Skład i łamanie:
Magdalena Śliwa

Projekt okładki:
Marcin Szklarczyk

Korekta:
Ewelina Chodźko

© Copyright by Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o.

ISBN 978-83-66489-21-9

Wydawca:
Wydawnictwo Naukowe TYGIEL sp. z o.o. ul. Głowackiego 35/341, 20-060 Lublin
www.wydawnictwo-tygiel.pl

Spis treści:

Oliwia Serej, Karolina Weron
Szczepionki nowej generacji jako wariant dla poprawy bezpieczeństwa jakości życia zwierząt 7

Martyna Mazur
Nowoczesne techniki diagnostyczne w detekcji boreliozy 20

Anna Szuba-Trznadel
Ocena wpływu wybranych dodatków paszowych na ograniczanie występowania Lawsonii intracellularis w stadach świń 32

Magdalena Gajęcka, Łukasz Zielonka, Maciej T. Gajęcki
Komplementarność badań niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej na wybrane wskaźniki zdrowotne niedojrzałych płciowo loszek 42

Piotr Wójcik
Wykorzystanie czujników ruchu w monitoringu zachowań behawioralnych bydła mlecznego 71

Katarzyna Godlewska
Jak certyfikowane systemy jakości i bezpieczeństwa żywności wspierają pracę Urzędowego Lekarza Weterynarii? 78

Ludmiła Kolek, Ilgiz Irnazarow
Badanie jakości nasienia z wykorzystaniem systemu CASA 94

Ewa Siucińska
Plastyczność mózgu na przykładzie kory baryłkowej myszy 106

Magdalena Stobiecka, Joanna Wajs
Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych pod względem kwasowości i zawartości tłuszczu 126

Indeks autorów 134

Oliwia Serej[1], Karolina Weron[2]

Szczepionki nowej generacji jako wariant dla poprawy bezpieczeństwa jakości życia zwierząt

1. Wstęp

Coraz więcej gatunków zwierząt hodowlanych przechodzi proces udomowienia. Interakcje człowiek-zwierzę mają duży wpływ na obniżenie stresu zwierząt, ich większą produktywność, a także odporność [1]. Posiadanie zwierząt domowych znalazło ogromne zastosowanie w poprawie zdrowia ludzi. Zbadano, że posiadanie zwierząt przez osoby starsze łagodzi objawy demencji i znacznie łagodzi zaburzenia poznawcze [2]. W innych badaniach wykazano kojące działanie psów i kotów na psychikę ludzką poprzez obniżenie produkcji kortyzolu z jednoczesnym zwiększeniem produkcji serotoniny, co powoduje zmniejszenie stresu i lepsze samopoczucie. Ponad 70 procent białka w diecie człowieka pochodzi od zwierząt. Wzrost demograficzny na świecie powoduje zwiększenie produkcji wyrobów mięsnych, a większa świadomość konsumencka i zdrowotna nakłada coraz bardziej rygorystyczne przepisy dotyczące jakości zwierzęcego mięsa. Powoli odchodzi się od podawania zwierzętom chorym antybiotyków, które są zastępowane szczepionkami [3]. Poprzez tak znaczący udział zwierząt w życiu ludzi, zaczęto zwracać większą uwagę na ich dobrostan. Mianem dobrostanu zwierząt określa się ich fizyczne, psychiczne i społeczne samopoczucie przy jednoczesnym braku drobnoustrojów chorobotwórczych w organizmie. Aldosteron, kortykosteron, kortyzol i kortyzon to główne hormony, które bierze się pod uwagę przy określaniu dobrostanu, przy czym dla zwierząt hodowlanych kortykosteron nie odgrywa znaczącej roli [4].

Głównym zadaniem szczepionek weterynaryjnych jest nie tylko poprawa dobrostanu i zdrowia zwierząt zarówno hodowlanych jak i domowych, ale także obrona przed przenoszeniem chorób odzwierzęcych na ludzi oraz uzyskiwanie dobrej jakości mięsa [5]. Szczepionki tradycyjne można podzielić na dwie grupy: konwencjonalne żywe i inaktywowane [6]. Główny mechanizm tych pierwszych polega na wywołaniu właściwej naturalnej odpowiedzi immunologicznej układu odpornościowego poprzez wprowadzenie do organizmu atenuowanej, lecz wciąż immunogennej jednostki chorobotwórczej [5]. Szczepionki inaktywowane zasadniczo opierają się na tym samym mechanizmie co żywe z tą różnicą, że wykorzystują zabite drobnoustroje chorobotwórcze. Biotechnologiczne ulepszenia szczepionek sprawiają, że powoli odchodzi się od konwencjonalnych metod szczepień weterynaryjnych [6]. W tej pracy dokonano szczegółowego przeglądu najpopularniejszych modyfikacji i rodzajów szczepionek mających na celu poprawę bezpieczeństwa i jakości życia zwierząt.

[1] Oliwiaserej101@gmail.com, Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Instytut Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.
[2] Karolina.weron@icloud.com, Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Instytut Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

2. Szczepionki wirusowe

Szczepionki wirusowe ze względu na zmienność genetyczną wirusów często muszą być modyfikowane wraz z pojawieniem się kolejnej modyfikacji patogenu. Dzielą się na trzy podstawowe grupy, gdzie każda z nich ma swoje wady i zalety (tab. 1):

- żywe atenuowane szczepionki wirusowe;
- szczepionki inaktywowane (antygeny łączone są z adiuwantami);
- genetycznie zmodyfikowane szczepionki wirusowe [7].

Tabela 1. Rodzaje oraz wady i zalety stosowanych szczepionek wirusowych [7]

Rodzaje szczepionek	Zalety	Wady
Żywe	Działanie podobne do naturalnej infekcji	Możliwy powrót do zjadliwości
	Zwiększona indukowana odpowiedź immunologiczna	Obecność czynników zakłócających
	Długi okres trwania nabytej odporności	Obecność zanieczyszczeń wirusowych
	Brak niepożądanych skutków ubocznych	Problemy z przechowywaniem
		Możliwość wystąpienia wirusów utajonych, które aktywują się po określonym czasie
Inaktywowane	Wirus nie ulega mutacjom genetycznym	Wymagają dużej ilości antygenu
		Krótkotrwała produkcja
	Łatwe w produkcji	Możliwość niecałkowitej inaktywacji patogenu
	Bezpieczniejsze od szczepionek żywych	Możliwość wystąpienia nieodpowiedniej reakcji na obce białko

Pierwszy z wymienionych typów szczepionek wykorzystuje żywe atenuowane wirusy (LAV), które mają za zadanie stymulować ochronną odpowiedź immunologiczną. Mechanizm tworzenia szczepionek polega na wielokrotnym pasażowaniu patogenuw celu jego osłabienia. Główne kryteria określające dobrą szczepionkę zostały spełnione przez niektóre typy LAV; wywołują silną odpowiedź immunologiczną z uwzględnieniem niskiego prawdopodobieństwa wywołania choroby przez samą szczepionkę. Jednak ze względu na możliwość przywrócenia wirulencji typu dzikiego, znacznie ograniczono stosowanie tego rodzaju praktyk [8].

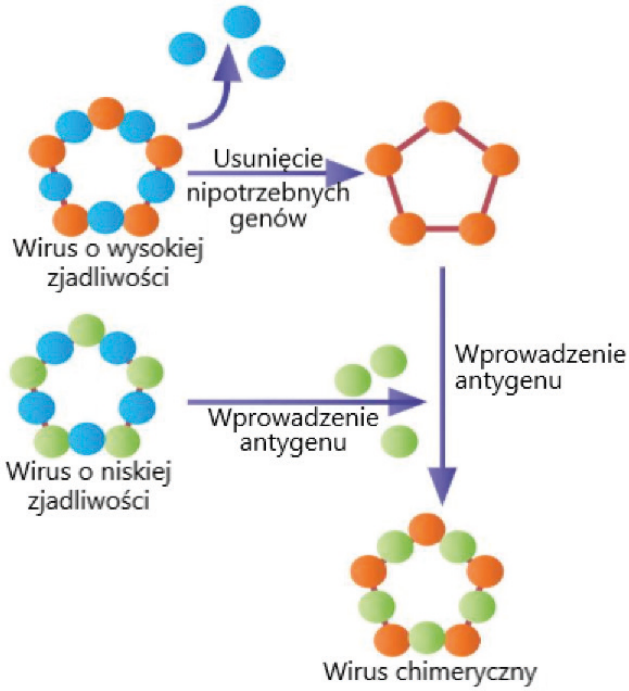
W trosce o bezpieczeństwo stosowanych szczepionek wirusowych najczęściej sięga się po technologie oparte na inaktywowaniu patogenu. Polega to na ograniczeniu zdolności wirusa do replikacji; w tym celu można zastosować metody zarówno

fizyczne, jak i chemiczne. Najczęściej do inaktywacji patogenu metodami chemicznymi używa się takich związków jak formaldehyd lub estry cykliczne. Fizyczne osłabienie wirusów polega na zastosowaniu różnych rodzajów promieniowania: jonizującego, termicznego czy elektromagnetycznego [9].

Genetycznie modyfikowane szczepionki wirusowe obejmują wszystkie typy, w których doszło do modulacji genomu patogenu. Rozwijająca się dziedzina biotechnologiczna, jaką jest inżynieria genetyczna pozwoliła na lepsze zrozumienie funkcji poszczególnych genów oraz umożliwiła zobrazowanie kompletnych sekwencji materiału genetycznego. Dzięki temu uzyskano dobrze zdefiniowane i stabilne rekombinowane wirusowe szczepionki weterynaryjne [5]. Usunięcie określonych genów w genomach wirusowych pozwoliło na opracowanie szczepionek markerowych i związanej z nimi strategii Differentiating Infected from Vaccinated Animals (DIVA). Dzięki temu możliwa była kontrola choroby Aujeszky'ego atakująca świnie [10]. Kolejnym postępem w produkcji innowacyjnych wirusowych szczepionek weterynaryjnych było stworzenie chimery, w której dochodzi do łączenia dwóch podobnych do siebie wirusów [11]. Wektory wirusowe (i nie tylko) również zostały użyte do stworzenia szczepionek. Po raz pierwszy zastosowano w tym celu wirusy krowianki, ospy drobiu i kanarków; dużym osiągnięciem było także opracowanej doustnej szczepionki przeciwko wściekliźnie [5]. Te i inne rodzaje szczepionek zostały szczegółowo opisane w poniższych rozdziałach.

3. Szczepionki chimeryczne

Wytwarzanie chimerycznych szczepionek polega na wstawieniu genów wirusa zjadliwego do wirusa pokrewnego, który nie charakteryzuje się dużą zjadliwością (rys. 1). Nowe antygeny są ułożone w tej samej konfiguracji, w jakiej były w wirusie wyjściowym, a ich ilość jest zwiększona.



Rysunek 1. Tworzenie szczepionki chimerycznej. Opracowanie własne na podstawie [12]

Koncepcję tworzenia szczepionek chimerycznych wykorzystano do zwalczania wirusa Zachodniego Nilu u koni. W tym celu zastosowano chimerę wirusową, która została stworzona poprzez wstawienie genów otoczki wirusa Zachodniego Nilu do kapsydu wirusa żółtej febry. Dzięki temu, patogen okazał się być znacznie mniej inwazyjny, a szczepionka bezpieczniejsza niż w przypadku wykorzystania wirusa typu dzikiego [12].

Chimeryczna szczepionka przeciw cirkowirusom, która jest stosowana u świń obejmuje szkielet genetyczny, który należy do cirkowirusa 1, niewykazującego patogenności, z genem, który koduje immunogenne białko kapsydowe patogennego cirkowirusa 2. Szczepionym świniom odporność nadają przeciwciała skierowane przeciwko białkom kapsydu cirkowirusa 2. Chimera cirkowirusa zachowuje wysoki poziom replikacji, co sprawia, że szczepionka jest niezwykle wydajna [13].

4. Szczepionki markerowe

Szczepionki markerowe pozwalają na odróżnianie poszczepiennej odpowiedzi immunologicznej od tej wywołanej przez patogeny powodujące wystąpienie infekcji [6]. Pierwsze ich zastosowanie odnotowano w latach 80. XX wieku, gdy nastąpiła potrzeba stworzenia szczepionek przeciw chA z delecją, w celu odróżnienia świń zakażonych wirusem SHV-1 od tych, które zostały poddane szczepieniom [14]. W celu wykorzystania tej metody dla innych chorób zakaźnych, powstała strategia DIVA stworzona do immuniozowania zwierząt i wykorzystująca szczepionki oparte na żywych mikroorganizmach; DNA; atenuowane; podjednostkowe lub peptydowe

[15, 16]. Istotą tego mechanizmu jest uzyskiwanie szczepionek markerowych poprzez selektywną utratę wybranych genów z genomu patogenów używanych do tworzenia szczepionki, co powoduje brak ekspresji białka kodowanego przez ten gen i w rezultacie brak obecności przeciwciał skierowanych przeciwko temu antygenowi w surowicy immunizowanego zwierzęcia. Ideą odróżnienia zwierząt szczepionych od tych z przebytą infekcją jest różnica obecności przeciwciał swoistych dla nieobecnego w szczepionkach antygenu [6]. Jako jedyne z obecnie opracowanych szczepionek, szczepionki markerowe są powiązane z testami serologicznymi, np. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) czy Immunoperoxidase Monolayer Assay (IPMA). Umożliwiają one monitorowanie transmisji wirusa typu dzikiego w zaszczepionej szczepionkami markerowymi populacji z jednoczesnym badaniem ich skuteczności [17, 18]. Zasadniczo, można wyróżnić trzy główne strategie markerowe:

• Marker ujemny charakteryzuje się brakiem przynajmniej jednego epitopu antygenowego, domeny lub białka wirusa typu dzikiego;

• Zewnętrzny marker pozytywny, do którego są włączane immunodominujące zewnętrzne epitopy lub białka;

• Samoistnie pozytywny marker, do którego włączany jest epitop lub immunogen pochodzące od wirusa typu dzikiego, lecz indukujące inny wzorzec przeciwciał niż odpowiednie dla wirusa typu dzikiego [15].

Najczęściej szczepionki markerowe pozytywne są niepraktyczne ze względu na ich zastosowanie, gdyż istotą prowadzenia metody jest odróżnienie i wykrycie zwierząt zakażonych w populacji zaszczepionej. Natomiast ideą szczepionek markerowych dodatnich jest detekcja jedynie osobników poszczepiennych [14].

Testy serologiczne przy współpracy ze szczepionkami markerowymi dają ostateczny wynik poprzez pomiar swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko białku, które zostało usunięte ze szczepionki. Wrażliwość i specyficzność ocenyzależygłównie od rodzaju odpowiedzi immunologicznej indukowanej przez szczepionkę oraz tej wywołanej naturalną infekcją. Zbyt późne wytworzenie oznaczanych przeciwciał może sprawić, że strategia DIVA okaże się niejednoznaczna [15].

Wirus choroby Aujeszky'ego (ADV) atakuje ośrodkowy układ nerwowy wszystkich ssaków z wyjątkiem ludzi i małp bezogoniastych. Najczęściej infekuje świnie, a następnie przez długi czas może pozostać w utajeniu. Powoduje duży wzrost śmiertelności u prosiąt i bezpłodność macior. Do opracowania szczepionki markerowej przeciwko ADV użyto odmiany typu Bartha ADV i usunięto za pomocą enzymów restrykcyjnych sekwencje kodujące glikoproteiny gE oraz gI. Izolacja patogenu i analiza za pomocą testu ELISA wykorzystującego przeciwciała skierowane przeciw usuniętym fragmentom genomu pozwoliła naukowcom na odróżnienie zwierząt zainfekowanych wirusem typu dzikiego od tych, które zostały poddane zaszczepieniu [19].

W zwalczaniu pryszczycy poprzez strategię DIVA wykorzystano szczepionki inaktywowane. Aktywnie replikujący się wirus produkuje zarówno strukturalne białka kapsydu VP1-VP4, jak i białka niestrukturalne 2A-C, 3A-D; inaktywowane patogeny wykorzystywane do tworzenia szczepionek, wraz z białkami strukturalnymi wytwarzają tylko proteinę 3D. Test ELISA, w którym wykorzystywane są przeciwciała wykrywające immunogenny polipeptyd 3ABC ocenia, które zwierzę zostało zaszczepione, a które uległo zakażeniu. Takie immunoglobuliny są w stanie wykazać

swoją obecność przez 560 dni, co czyni tę metodę jako najbardziej wiarygodną w wykrywaniu zakażenia pryszczycą [14].

Pomimo wielu zastosowań, jakie daje strategia DIVA, główną wadą, jaką niesie jest zakłócanie nadzoru infekcji na podstawie testów serologicznych. Szczepionki markerowe zagrażają statusom państw wolnych od określonej infekcji, co może prowadzić do ograniczenia międzynarodowego handlu. Z tego względu, pomimo skuteczności i dostępności, zabronione jest stosowanie ich w krajach wolnych od chorób zakaźnych [5].

5. Rekombinowane szczepionki wektorowe

Według Europejskiej Agencji Medycznej (EMEA), rekombinowane szczepionki wektorowe to preparaty jednego lub więcej rodzajów żywych patogenów (bakterii lub wirusów), do których została wstawiona jedna lub więcej sekwencji materiału genetycznego. Muszą mieć stabilny fenotyp o niskiej patogenności w odniesieniu do gatunku, dla którego przeznaczono szczepionkę. Manipulacja genetyczna powinna prowadzić do trwałego usunięcia określonego genu lub nieodwracalnej mutacji [20]. Wstawione DNA lub RNA pochodzi od określonego immunogennego patogenu; wektorem dla szczepionek mogą być bakterie, wirusy lub drożdże. Kryteria, które są brane pod uwagę przy doborze odpowiedniego wektora obejmują możliwą ilość wstawienia obcego DNA; szybkość replikacji w organizmie docelowym; indukcję i czas trwania odpowiedzi immunologicznej; koszty produkcji [21].

Dobrym przykładem bakteryjnych wektorów jest często spotykana Gram-ujemna bakteria *Escherichia coli*. W procesie produkcji do szczepionki zostają włączone antygeny drobnoustroju chorobotwórczego, który jest odpowiedzialny za wywołanie infekcji zakaźnej, do genomu wektora. Jako adiuwanty do szczepionki wykorzystuje się obecne w ścianie komórkowej *E. coli* lipopolisacharydy [17].

Wirusowe weterynaryjne szczepionki wektorowe stanowią atrakcyjny wariant do dostarczenia antygenów organizmowi docelowemu. Tak jak w przypadku szczepionek DNA, są w stanie wprowadzać obcy materiał genetyczny do zwierzęcia, co prowadzi do wytworzenia określonego antygenu. Właściwa odpowiedź immunologiczna obejmuje stymulację limfocytów B, komórek T (CD4+) oraz komórek T cytotoksycznych (CTL, CD8+) [7]. W skład wektorów wirusowych wchodzą Pokswirusy, Adenowirusy i Herpeswirusy [21].

Właściwości Herpeswirusów uplasowały je na wysokim miejscu wśród używanych wektorów wirusowych. Są w stanie wprowadzić dużą ilość endogennego kwasu nukleinowego i wywołać trwałą odpowiedź immunologiczną. Dodatkowo patogeny te nie są onkogenne i stosunkowo mało zjadliwe; uważa się, że wektory herpeswirusa inicjują i utrzymują odporność ochronną swoistą dla antygenu przez całe życie zwierzęcia [22]. Pozwoliło to na opracowanie szczepionek ograniczających szereg chorób wśród zwierząt.

Herpeswirusy psów (CHV) wywołują śmiertelną w swoich skutkach martwicę u szczeniąt. Ze względu na niską zjadliwość i delecję genów w genomie, wirusy CHV zostały z powodzeniem użyte do opracowania osłabionej rekombinowanej szczepionki wektorowej chroniącej nie tylko przed spowodowaną przez nie infekcją, ale także przed szeregiem innych patogenów. Dodatkowo ze względu na swój ograniczony zasięg i niską immunogenność w stosunku do dorosłych zwierząt, CHV użyto do

opracowania terapii genowej dla psów domowych [23]. Inne rodzaje herpeswirusów, takie jak herpeswirusy indyka (HVT) zostały wykorzystane do opracowania szczepionek wektorowych zwalczających choroby drobiu. HVT posiada zdolność do wywoływania trwałej infekcji w obecności przeciwciał matczynych (MDA) u piskląt, przez co opierające się na nich szczepionki wektorowe prowadzą do powstania trwałej odporności zwierząt po zaaplikowaniu jednej dawki do zarodka lub jednodniowego pisklęcia. Unikalne właściwości HVT doprowadziły do stworzenia rekombinowanych wektorowych szczepionek wirusowych poprzez integrację genomu wirusa z kosmidem lub bakteryjnym sztucznym chromosomem (BAC) umożliwiających szybkie, ukierunkowane wprowadzenie genów kodujących antygeny innych wirusów do organizmu szczepionego zwierzęcia. Badania wykazały, że szczepionki skutecznie ochroniły szczepione kurczęta, które zostały eksponowane na działanie wysoce zjadliwego wirusa H7N1 [24].

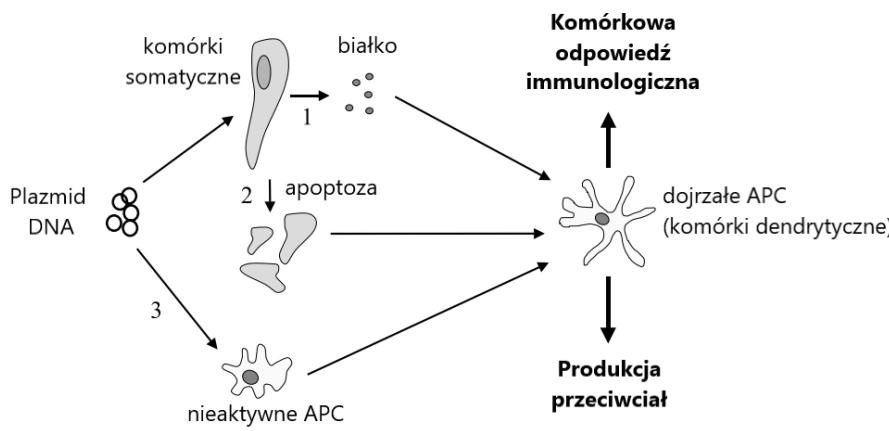
Adenowirusy są wysoce skuteczną podstawą do tworzenia szczepionek o wysokiej immunogenności. Posiadają zdolność dostarczania dużej ilości antygenów do szczepionego organizmu; indukują szybką migrację limfocytów T w obrębie układu limfatycznego; szybko i trwale stymulują limfocyty T do odpowiedzi na wysokim poziomie [25]. Badania pokazują, że wadliwa replikacja wektorów AdV prowadzi do wyższej indukcji odpowiedzi limfocytów B i T w porównaniu do innych wykorzystywanych wektorów, jednak w przypadku limfocytów T CD4+ odpowiedź jest dość niska ze względu na brak ustanowienia właściwej infekcji litycznej w organizmie gospodarza [26]. Głównym problemem szczepionych młodych zwierząt jest niski poziom matczynych przeciwciał. Nie są w stanie zapewnić całkowitej ochrony młodego organizmu, lecz powodują zakłócenie działania konwencjonalnych szczepionek [27]. Dużą zaletą wykorzystywania wektorów adenowirusowych w szczepionkach jest brak wpływu matczynych przeciwciał na działanie leku. Wykazano to poprzez wykorzystanie wektora AdH5 z delecją E1 uniemożliwiającą replikację, do opracowania szczepionki przeciwko świńskiej grypie (SIV). Zaszczepiono grupę prosiąt, których matka była narażona na infekcję SIV mieszaniną szczepionek wektorowych z antygenem hemaglutyniny i nukleoproteiny SIV, przy czym grupie kontrolnej podano dostępną na rynku szczepionkę SIV H1N1. Po kilku tygodniach jedynie w grupie badanej nie wykazano infekcji wirusem świńskiej grypy [26].

Jako że pies jest głównym wektorem do przenoszenia wścieklizny, jest to choroba stanowiąca niezwykle duże zagrożenie zarówno dla ludzi, jak i zwierząt [28]. Opracowano wysoce replikacyjny wektor adenowirusowy HAd5, który ekspresjonuje glikoproteinę wścieklizny (RG), co spowodowało wzrost odporności zarówno u zwierząt dzikich, jak i domowych. Szczepionkę można podawać domięśniowo, donosowo lub podskórnie, ponieważ doustna aplikacja nie wykazała oczekiwanej odpowiedzi immunologicznej. Dużą przewagą szczepionek wektorowych nad komercyjnymi jest możliwość zmniejszenia częstotliwości immunizacji, ponieważ do tej pory szczepienia wymagane są co najmniej co 3 lata [25].W celu walki z popularną chorobą klasycznego pomoru świń (CSFV) zrekombinowano świński adenowirusPAV (rPAV) z genem gp55 (E2) pochodzącym z CSFV. Wykonano badania sprawdzające wpływ szczepionki na zwierzęta; skutecznie wykazano indukcję odpowiedzi immunologicznej w szczepionym organizmie, przy jednoczesnym braku

niepokojących skutków ubocznych [29]. Pomimo wielu zaletadenowirusowych szczepionek wektorowych, istnieją także ich pewne wady. Jedną z nich jest wystąpienie potencjalnej toksyczności wektorów, co może prowadzić do szkodliwych skutków ubocznych w organizmie gospodarza [30].

6. Szczepionki DNA

Koncepcją szczepionek DNA jest wykorzystanie materiału genetycznego, który wprowadzony powoduje skuteczną ekspresję białka in vivo wywołującego odpowiedź immunologiczną. Składa się ona na odpowiedź komórkową (CMI) i humoralną (HIR) [31]. W porównaniu do szczepionek powszechnie dostępnych na rynku, szczepionki DNA mają szereg zarówno zalet jak i wad, które zostały szczegółowo omówione (tab. 3) [32]. Istnieją także doniesienia o szczepionkach RNA lecz jest ich tak niewiele, że cały mechanizm szczepień opierający się na kwasach nukleinowych dokumentowany jest przy użyciu DNA [33]. Ich mechanizm opiera się na wprowadzeniu do komórek immunizowanego organizmu zwierzęcia plazmidowego materiału genetycznego kodującego białko będące swoistą ochroną antygenową, które następnie indukuje procesy transkrypcji i translacji prowadząc do powstania antygenów uodparniających [6]. Główną rolę w wywoływaniu odpowiedzi immunologicznej pełnią komórki APC (głównie dendrytyczne). Mogą być one aktywowane w różnoraki sposób (rys. 2): 1) transfekowane komórki somatyczne wydzielają białka, które prowadzą do pobudzenia komórek dendrytycznych; 2) transfekowane komórki somatyczne są kierowane do procesu apoptozy, która powoduje pobudzenie komórek dendrytycznych; 3) plazmid bezpośrednio działa na nieaktywne komórki dendrytyczne indukując ich aktywację [34].



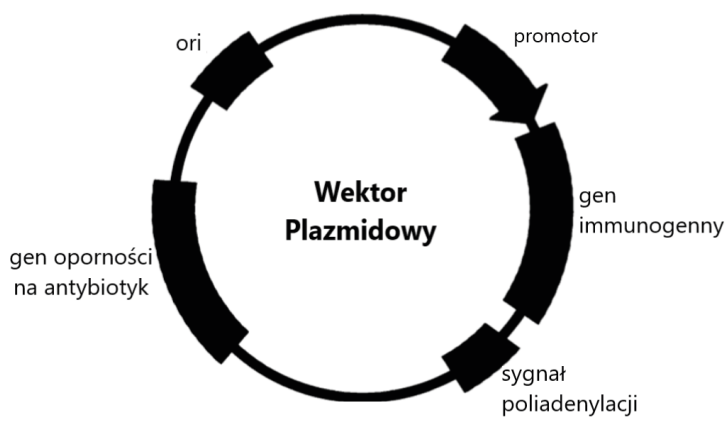
Rysunek 2. Aktywowanie odpowiedzi immunologicznej za pomocą plazmidowego DNA. Opracowanie własne na podstawie [34]

Plazmid niosący antygen musi zawierać promotor pochodzący z wirusa cytomegalii (CMV), który kontroluje proces transkrypcji i translacji; sekwencję sygnałową poliadenylacji zapewniającą stabilność i prawidłowość tłumaczenia; gen oporności na antybiotyk odpowiadający za selekcję; a także sekwencje ori odpowiadające za bakteryjną inicjację replikacji (rys. 3); zarówno promotor, jak i sekwencje kodujące

zakończenie transkrypcji ułatwiają ekspresję plazmidu w komórkach eukariotycznych [35]. Dodatkowo ważnym składnikiem szczepionek DNA jest obecność w obrębie plazmidu sekwencji odpowiedzialnych za immunostymulację (ISS), w skład których wchodzą niemetylowane wyspy CpG. Ich obecność warunkuje aktywację limfocytów B promujących wytwarzanie przeciwciał i aktywację makrofagów oraz komórek dendrytycznych, co prowadzi do uwydatnienia prezentacji antygenu oraz zwiększenia ilości komórek NK (ang. *natural killer, naturalni zabójcy*). Przyjmuje się więc, że wyspy CpG działają jako endogenne adiuwanty niezależnie od antygenu [34]. Ilość plazmidowego DNA w szczepionce *in vitro* różni się w zależności od wielkości zwierząt (tab. 2), lecz przy stosowaniu w warunkach *in vivo* zalecane jest znaczne zwiększenie ilości plazmidu ze względu wprost proporcjonalną zdolność szczepionki do immunogenności [31, 36].

Tabela 2. Ilość plazmidowego DNA w zależności od modelu zwierzęcego [38]

Szczepionki DNA in vitro	
Model immunizowanego zwierzęcia	Ilość wprowadzanego plazmidu (µg)
Mysz	10-100
Małe zwierzę	100-300
Duże zwierzę	500-2500



Rysunek 3. Budowa wektoru plazmidowego powszechnie używanego do szczepionek DNA. Opracowanie własne na podstawie [31]

Opisanych jest wiele metod transfekcji DNA plazmidowego do komórek [37], lecz w tym wypadku najczęściej wykorzystuje się mikroiniekcję, elektroporację lub biolistyczny system dostarczania cząstek w przypadku *in vitro*; w warunkach in vivo stosuje się biolistyczne wprowadzanie cząstek lub tradycyjne domięśniowe wstrzykiwanie substancji; wadą tego ostatniego jest ograniczona objętość wprowadzanej szczepionki, ponieważ wynosi ona jedynie 1 ml [21, 36]. W modelu *in vivo* po wprowadzeniu szczepionki DNA, białko zachowuje swoją trzeciorzędową

strukturę dzięki modyfikacjom potranslacyjnym, a następnie antygeny są prezentowane przez komórki APC (komórki dendrytyczne) [34].

Pierwsze badania skuteczności szczepionek DNA były przeprowadzane na drobiu w kontekście wirusa grypy ptaków (AIV) w 1993 roku. Z powodzeniem udało się odnieść sukces na małych modelach zwierzęcych, lecz przy dużych organizmach istniał problem z brakiem immunogenności i ograniczeniem dostarczania plazmidu. W celu zwiększenia skuteczności leczenia opracowano koncepcję jednoczesnego aplikowania szczepionek wraz z adiuwantami lub koekspresję genu adiuwanta poprzez włączenie go do plazmidu obecnego w szczepionkach. Za zwiększenie komórkowej i humoralnej odporności indukowanej przez szczepionki DNA odpowiadają geny immunomodulacyjne, na które składają się HSP70, Esat-1, MDP-1, HMGB1ΔC, a także cytokiny (IL-15, IL-18) [33].

Szczepionki DNA zastosowano do zwalczania chorób wszelkiego rodzaju zwierząt [34]. Wirus niedoboru odporności kotów (FIV) ma mechanizm podobny do działania ludzkiego wirusa HIV. Atakuje koty zarówno dzikie, jak i domowe, a dobranie odpowiedniej szczepionki jest niezwykle utrudnione. Mechanizm działania wirusa opiera się na atakowaniu limfocytów zwierzęcia poprzez zmniejszenie ilości białek powierzchniowych CD4 na komórkach T, dodatkowo jest on niezwykle zmienny genetycznie. Szczepionki DNA są do tej pory jedynym wyjściem na ograniczenie rozprzestrzeniania się FIV, ponieważ opracowywane inne rodzaje ochrony nie przyniosły oczekiwanych rezultatów [38]. W celu zwalczania wścieklizny za pomocą szczepionek DNA, zastosowano gen glikoproteiny Gobecny w wirusie wywołującym tę chorobę. U psów wywołało to znaczne zwiększenie ilości przeciwciał skierowanych przeciwko temu wirusowi [39].

Tabela 3. Zestawienie zalet i wad stosowania szczepionek DNA [32]

Szczepionki DNA	
Zalety	Wady
Długotrwała immunogenność	Stosunkowo słaba immunogenność
Koncentracja odpowiedzi immunologicznej jedynie na wprowadzanym antygenie	Ograniczenie do immunogenów białkowych; nieprzydatne w przypadku antygenów niebiałkowych
Bezpieczne, stabilne, łatwe w obsłudze	Nietypowe przetwarzanie białek bakteryjnych i pasożytniczych
Niedrogie	Możliwe problemy onkologiczne
Wywoływanie odpowiedzi humoralnej i komórkowej	Możliwość indukcji tolerancji immunologicznej przez antygeny wyrażane w organizmie
Możliwość wprowadzenia mieszaniny plazmidów w celu utworzenia szczepionki o szerokim spektrum działania	Indukowanie wytwarzania przeciwciał skierowanych przeciwko DNA

7. Podsumowanie

Weterynaryjne szczepionki nowej generacji, jakie dostarcza współczesna biotechnologia pozwalają na znaczne ograniczenie rozprzestrzeniania się chorób odzwierzęcych. Dzięki modyfikacji szczepionkowych patogenów (m.in. usuwanie genów replikacyjnych) uniknięto występowania powikłań poszczepiennych z równoczesną skutecznością i długotrwałym okresem utrzymywania się odpowiedzi immunologicznej [17]. Aby stały się one powszechnie dostępne na rynku, niezbędne jest zadbanie o bezpieczeństwo, łatwość wykonania i koszty produkcji. Niemniej jednak, ciągłe rozwijanie się biotechnologii w dziedzinie immunologii, pozwala na coraz lepsze poznawanie mechanizmów towarzyszących wywoływanej odpowiedzi immunologicznej przez patogeny. Daje to nadzieję na występowanie coraz mniejszej liczby chorób, na które szczepionki nie zostały jeszcze stworzone, a które znacznie poprawiłyby komfort życia zarówno u ludzi, jak i u zwierząt [25].

Literatura:

1. Zulkifli I., *Review of human-animal interactions and their impact on animal productivity and welfare*, Journal of Animal Science and Biotechnology, 2013.
2. Cherniack E.P., Cherniack A.R., *The benefit of pets and animal-assisted therapy to the health of older individual*, Current Gerontology and Geriatrics Research, 2014.
3. National Research Council, Board on Agriculture, Committee on Technological Options to Improve the Nutritional Attributes of Animal Products, Designing Foods: Animal Product Options in the Marketplace, National Academies Press, 1988.
4. Marć-Pieńkowska J., Topolińska P., Mitura K., *Poziom stresu wskaźnikiem dobrostanu zwierząt*, Wiadomości Zootechniczne, 2014.
5. Meeusen E.N., Walker J., Peters A., Pastoret P.P., Jungersen G., *Current status of veterinary vaccines*, Clinical Microbiology Reviews, 2007.
6. Truszczyński M., Pejsak Z., *Aktualna ocena szczepionek stosowanych w profilaktyce weterynaryjnej*, Życie Weterynaryjne, 2010.
7. Gadissa L., Yune N., *Update on Veterinary Viral Vaccines: A Review*, Journal of Veterinary Science & Research, 2018.
8. Lauring A.S., Jones J.O., Andino R., *Rationalizing the development of live attenuated virus vaccines*, Nature Biotechnology, 2010.
9. Brun A., *Vaccines and Vaccination for Veterinary Viral Diseases: A General Overview*, Methods in Molecular Biology, 2016.
10. Pasick J., *Application of DIVA vaccines and their companion diagnostic tests to foreign animal disease eradication*, Animal Health Research Reviews, 2004.
11. Tesh R.B., Arroyo J., Travassos Da Rosa A.P.A., Guzman H., Xiao S.Y., Monath T.P., *Efficacy of killed virus vaccine, live attenuated chimeric virus vaccine, and passive immunization for prevention of West Nile virus encephalitis in hamster model*, Emerging Infectious Diseases, 2002.
12. Tizard I.R., *Vaccines for Veterinarians*, Elsevier, 2019.
13. Maclachlan N.J., Dubovi E.J., *Fenner's Veterinary Virology*, Academic Press, 2010.
14. Szweda W., *Strategia DIVA w zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt*, Medycyna Weterynaryjna, 2009.
15. Dong X.N., Chen Y.H., *Marker vaccine strategies and candidate CSFV marker vaccines*, Vaccine, 2007.
16. van Oirschot J.T., Kaashoek M.J., Rijsewijk F.A., Stegeman J.A, *The use of marker vaccines in eradication of herpesviruses*, Journal of Biotechnology, 1996.
17. Truszczyński M., Pejsak Z., *Szczepionki nowej generacji*, Medycyna Weterynaryjna, 2006.
18. van Oirschot J.T., *DIVA vaccines that reduce virus transmission*, Journal of Biotechnology, 1999.
19. Vannie P., Capua I., Le Potier M.F., Mackay D.K.J., Muylkens B., Parida S., Paton D.J.,

Thiry E., *Marker vaccines and the impact of their use on diagnosis and prophylactic measures*, Revue Scientifique et Technique, 2007.
20. European Medicines Agency Veterinary Medicines and Inspection, Guideline on Live Recombinant Vector Vaccines for Veterinary Use, 2005, EMEA/CYMP/004/04-FINAL
21. Rajasekaran R., Kirubaharan J.J., Vidhya M., *Recombinant veterinary vaccines*, Indian Farmer, 2018.
22. Williams L.B.A., Fry L.M., Herndon D.R., Fransceschi V., Schneider D.A., Donofrio G., Knowles D.P., *A recombinant bovine herpesvirus-4 vectored vaccine delivered via intranasal nebulization elicits viral neutralizing antibody titers in cattle*, Public Library of Science One, 2019.
23. Kamel M., El-Sayed A., *Utilization of herpesviridae as recombinant viral vectors in vaccine development against animal pathogens*, Virus Research, 2019.
24. Baron M.D., Iqbal M., Nair V., *Recent advances in viral vectors in veterinary vaccinology*, Current Opinion in Virology, 2018.
25. Ferreira T.B., Alves P.M., Aunins J.G., Corrondo M.J.T., *Use of adenoviral vectors as veterinary vaccines*, Gene Therapy, 2005.
26. Ndi O.L., Barton M.D., Vanniasinkam T., *Adenoviral Vectors in Veterinary Vaccine Development: Potential for Further Development*, World Journal of Vaccines, 2013.
27. Niewiesk S., *Maternal antibodies: clinical significance, mechanism of interference with immune responses, and possible vaccination strategies*, Frontiers in Immunology, 2014.
28. Satora M., Rudy A., Płoneczka-Janeczko K., *Aktualna sytuacja dotycząca zakażeń wirusem wścieklizny – czy należy obawiać sięnietoperzy?*, Życie Weterynaryjne, 2018.
29. Hammond J.M., McCoy R.J., Jansen E.S., Morrissy C.J., Hodgson A.L., Johnson M.A., *Vaccination with a single dose of a recombinant porcine adenovirus expressing the classical swine fever virus gp55 (E2) gene protects pigs against classical swine fever*, Vaccine, 2000.
30. Sharma A., Bangari D.S., Tandon M., Hogenesch H., Mittal S.K., *Evaluation of innate te immunity and vector toxicity following inculation of bovine, porcine or human adenoviral vectors in a Mouse model*, VirusResearch, 2010.
31. Dhama K., Mahendran M., Gupta P.K., Rai A., *DNA vaccines and their applications in veterinary practice: current perspectives*, Veterinary Research Communications, 2008.
32. Khan K.H., DNA vaccines: roles against diseases, Germs, 2013.
33. Jazayeri S.D., Poh C.L., *Recent advances in delivery of veterinary DNA vaccines against avian pathogens*, Veterinary Research, 2019.
34. Dunham S.P., *The application of nucleic acid vaccines in veterinary medicine*, Research in Veterinary Science, 2002.
35. Kurath G., *Biotechnology and DNA vaccines for aquatic animals*, Revue Scientifique et Technique, 2008.
36. Hutnick N.A., Myles D.J.F., Bian C.B., Muthumani K., Weiner D.B., *Selected approaches for increasing HIV DNA vaccine immunogenicity in vivo*, Current Opinion in Virology, 2011.
37. Kim T.K., Eberwine J.H., *Mammalian cell transfection: the present and the future*, Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010.
38. Redding L., Weiner D.B., *DNA vaccines in veterinary use*, Expert Review of Vaccines, 2009.
39. Osorio J.E., Tomlinson C.C., Frank R.S., Hannes E.J., Rushlow K., Haynes J.R., Stinchcomb D.T., *Immunization of dogs and cats with a DNA vaccine against rabies virus*, Vaccine, 1999.

Szczepionki nowej generacji jako wariant dla poprawy bezpieczeństwa jakości życia zwierząt

Streszczenie

Przez wiele lat zwierzęta zaczęły odgrywać coraz większą rolę w życiu człowieka. Stanowią filary gałęzi przemysłowych oraz wniosły znaczący wkład w sektor leczniczy. Stąd, ich profilaktyka zdrowotna ma nie tylko kluczowy i bezpośredni wpływ na kondycję gospodarczą, ale również jest niezwykle ważna dla zdrowia publicznego w kontekście bezpieczeństwa żywności oraz możliwości transmisji niebezpiecznych chorób ze zwierząt na ludzi. Czynniki te zmusiły biotechnologów do opracowania nowych wyzwań mających na celu stworzenie innowacyjnych produktów, które pozwoliłyby na znaczne zwiększenie komfortu życia zwierząt oraz zapewnienie większej ochrony człowieka przed chorobami odzwierzęcymi. Idealnymi do tego typu wyzwań okazały się być szczepionki, których wprowadzenie pozwoliło na znaczne lub całkowite wyeliminowanie w krajach rozwiniętych popularnych chorób zwierząt, jakimi są między innymi wścieklizna czy pomór bydła. Celem niniejszej pracy było dokonanie przeglądu aktualnie dostępnych lub opracowywanych szczepionek nowej generacji, dzięki którym dokonano znacznego postępu w zwalczaniu chorób zwierzęcych w porównaniu do konwencjonalnych preparatów. Szczególny nacisk położono na scharakteryzowanie takich produktów leczniczych jak: szczepionki znakowane, szczepionki DNA, szczepionki chimeryczne, rekombinowane szczepionki wirusowe i te z cząstkami wirusopodobnymi. Dodatkowo przedyskutowano wady i zalety każdej z grup, jak również efekty związane z ich zastosowaniem.

Słowa kluczowe: nowoczesne szczepionki weterynaryjne, DIVA, choroby zwierzęce, dobrostan zwierząt

New generation vaccines as a variant for improving the safety of animal quality of life

Abstract

Over the years, animals began to play an important role in humans life. They became essential in industry and gave a noticeable impact on medicine. Therefore, vaccines' health prevention is essential and has a direct impact on countries' economics, but what is more, it is priceless in public health in the context of food safety and potential disease contagion from animal to human. Those circumstances made biotechnologists face new challenges, which completing could allow to improve the comfort of animals' life and protect humans from zoonotic diseases in a noticeable way. It turns out that vaccines are perfectly suited for those challenges and their implementation has made it possible to decrease or almost fully eliminate in developed countries common animal diseases, such as rabies and cattle plague. The purpose of this work was to review currently availableor new generation vaccines being developed that have made significant progress in combating animal diseases compared to conventional preparations. The special emphasis has been paid to the characterization of medicinal products such as labeled vaccines,DNA vaccines, chimeric vaccines, recombinant viral vaccines, and those with virus-like particles. Besides, the pros and cons of each group were discussed, as well as the effectsassociated with their use.

Keywords: modern veterinary vaccines, DIVA, animal diseases, animal welfare

Martyna Mazur[1]

Nowoczesne techniki diagnostyczne w detekcji boreliozy

1. Charakterystyka choroby oraz współczesne techniki detekcji

Borelioza jest wieloukładową chorobą wywołaną przez infekcje krętkiem Borrelia burgdorferi. Jedynym wektorem przenoszącym krętka na człowieka jest kleszcz z rodzaju *Ixodes*. Detekcja boreliozy jest trudnym i żmudnym procesem, którego problemowość związana jest głównie z dużą różnorodnością gatunków, jakie wywołują chorobę oraz ich zdolnością do utajenia w organizmie gospodarza przez długi okres. Zakażenie krętkiem może wywoływać różne objawy, takie jak wędrujący rumień (EM), choroba grypopodobna, zapalenie stawów, zapalenie mięśnia sercowego, objawy neurologiczne [1]. Często też zdarza się, że infekcja przebiega bezobjawowo. Obecnie znane techniki wykorzystywane do detekcji *B. burgdorferi* dzielimy na pośrednie oraz bezpośrednie. Do grupy pośrednich metod zaliczamy test immunoenzymatyczny (ELISA), Western Blot, test mikroprzepływowy (mChip-Ld), test choroby odkleszczowej (TBD-Serochip) oraz chemiluminescencyjny system Liaison. Do bezpośrednich natomiast: reakcja łańcuchowej polimerazy (PCR), reakcja łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR), zagnieżdżona reakcja łańcuchowej polimerazy (Nested-PCR), izotermiczna amplifikacja ze spektrometrią masową wykorzystująca jonizację przez elektrorozpylanie (IA/PCR/ESI-MS), test wzmocnienia izotermicznego za pośrednictwem pętli (LAMP), test amplifikacji z rekombinowaną polimerazą (RPA), test transformacji limfocytów (LTT-MELISA) oraz sekwencjonowanie nowej generacji (NGS). W celu zwiększenia specyficzności w wykrywaniu krętka Polskie Towarzystwo Epidemiologów i Lekarzy Chorób Zakaźnych (PTEiLChZ) zaleca stosowanie dwuetapowej procedury, która obejmuje test ELISA oraz Western Blot [2]. Należy jednak pamiętać, że szybkie wykrycie infekcji jest kluczowe dla pomyślnej antybiotykoterapii. Pomimo stale obserwowanego rozwoju metod detekcji obecnie nie posiadamy „złotej metody", która wykazywałaby stuprocentową specyficzność, czułość, krótki czas realizacji oraz rozróżnienie infekcji aktywnej od nieaktywnej [3]. Stąd, istnieje potrzeba poszukiwania nowych technik diagnostycznych, które ułatwią detekcję boreliozy [4].

2. Pośrednie techniki detekcji *B. burgdorferi*

Pośrednie metody wykorzystywane do detekcji krętka opierają się na wykrywaniu przeciwciał skierowanych przeciwko odpowiednim antygenom krętka [5]. Skuteczne wykrycie patogenu metodami pośrednimi, uzależnione jest od osiągnięcia przez układ odpornościowy odpowiedniego poziomu immunoglobulin (IgG, IgM, IgA) [2, 6], przeciwko *B. burgdorferi*. Szczytowy poziom przeciwciał występuje około 3-6 tygodnia po ukąszeniu kleszcza [6]. Dlatego wykorzystanie pośrednich metod detekcji jest uzasadnione tylko u pacjentów, u których wyniki kliniczne ukazują późne stadium choroby [2].

[1] martyna16453@wp.pl, Zakład Fizjologii i Rozrodu Zwierząt, Instytut Biologii i Biotechnologii, Uniwersytet Rzeszowski.

2.1. Dwupoziomowy system detekcji *Borrelia burgdorferi*

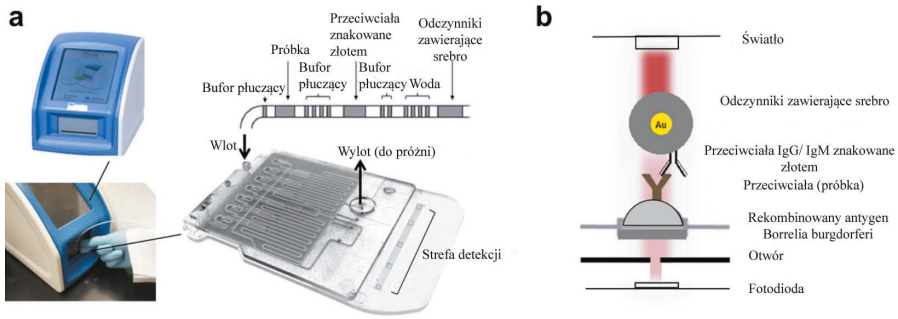
Obecnie „złotym standardem" stosowanym do detekcji krętka jest algorytm rekomendowany przez PTEiLChZ obejmujący techniki ELISA oraz Western Blot (WB). Pierwszym etapem dwupoziomowej techniki jest detekcja wysoko czułą metodą ELISA-C6 [7]. Gdy w próbce surowicy znajdują się przeciwciała skierowane przeciwko *B. burgdorferi* dochodzi do ich związania z 25 aminokwasowym [8], syntetycznym peptydem C6, który pochodzi z wysoce-specyficznego i immunogennego białka VlsE *B. burgdorferi* sensu lato oraz sensu stricto [6]. Połączenie przeciwciała z peptydem C6 jest wykrywane przez koniugat anty-ludzkie przeciwciała IgG/IgM skoniungowane z enzymem [6]. Dalsze etapy polegają na usunięciu niezwiązanych przeciwciał drugorzędowych oraz na dodaniu chromogennego substratu np. tetrametylobenzydyny, którego utlenianie katalizowane przez enzym będzie skutkowało wytworzeniem barwnego produktu. Reakcję zatrzymuje się roztworem np. kwasu siarkowego, po którym prowadzi się spektrofotometryczny pomiar zabarwienia roztworu, którego intensywność jest proporcjonalna do ilości przeciwciał IgM, IgG obecnych w badanej surowicy. Dane spektrofotometryczne następnie przekształca się i podaje jako wskaźnik Lyme (LI) [6], w zależności od którego podejmuje się odpowiednie kroki. Wartość LI przeciwciał znajdująca się w zakresie niejednoznacznym lub pozytywnym musi być testowana za pomocą Western Blot. Ze względu na wysoką specyficzność oraz brak reakcji krzyżowych [7], WB wykonuje się w celu odróżnienia wyników fałszywie pozytywnych od rzeczywistych. Procedura polega na elektroforetycznym rozdziale SDS-PAGE zrekombinowanych białek krętka *B. burgdorferi* sensu lato i sensu stricto. Następnie, surowicę pacjenta inkubuje się z syntetycznymi nitrocelulozowymi paskami Lyme [9]. Związane przeciwciała znajdujące się w surowicy, wykrywane są drugorzędowymi przeciwciałami anty-ludzkimi sprzężonymi ze znacznikiem fluorescencyjnym. Pozytywny wynik określa powstanie czterech lub więcej intensywnych pasm specyficznych dla IgG oraz IgM:

- 18 kDa (fragment flageliny DbpA/P18);
- 22 kDa (OspC);
- 26 kDa (OspF);
- 30 kDa (OspA);
- 32 kDa (OspA);
- 34 kDa (OspB/Vlse);
- 39 kDa (BmpA);
- 43 kDa;
- 46 kDa;
- 58 kDa;
- 92 kDa;
- 41 kDa (FlaB), który jest konieczny dla stwierdzenia pozytywnego wyniku [10].

2.2. Test mikroprzepływowy mChip-Ld

Nowoczesną techniką detekcji boreliozy w stosunkowo szybkim czasie jest mikroprzepływowy test mChip-Ld, którego aparaturę przedstawia (rys. 1). Działanie testu jest podobne do obecnej dwupoziomowej techniki zalecanej przez PTEiLChZ, jednak jego czas analizy jest znacznie krótszy (15 minut), a czułość i specyficzność znacznie większe [11]. Ilościowy pomiar przeciwciał IgG oraz IgM jest możliwy

dzięki zastosowaniu rekombinowanych antygenów Borrelia burgdorferi (PepVF, rOspC-K, rOspC-B, VlsE, rP41, rP100, rDbpB, rBmpA, rDbpA) podawanych w reakcji w odpowiednich stężeniach [11]. Metoda mChip-Ld polega na wtryskowym dostarczaniu reagentów przez urządzenie na plastikowe kasety mikroprzepływowe opłaszczone antygenami *B. burgdorferi*. Wykrycie przeciwciał w ludzkiej surowicy jest możliwe dzięki specyficznym anty-hIgG i anty-hIgM sprzężonym z cząsteczkami złota oraz odczynnikami zawierającymi cząsteczki srebra [12]. Redukcja światła przez cząsteczki amplifikowanego srebra jest mierzona za pośrednictwem analizatora stacjonarnego składającego się z diod elektroluminescencyjnych (LED) i fotodetektorów [12]. Otrzymany wynik jest podawany postaci gęstości optycznej (OD).



Rysunek 1. Aparatura mChip-Ld. (a) Plastikowa kaseta mikroprzepływowa jest umieszczana w blacie analizatora, który służy do zasilania przepływu roztworem, kontrolowania wartości zadanych oraz wykrywania sygnałów. (b) Schemat układu biochemicznego i optycznego. Zmodyfikowane za: [12]

2.3. TBD-Serochip

Multipleksowa technika oparta na macierzach technika, którą wykorzystuje się do detekcji ludzkich przeciwciał skierowanych przeciwko krętkom *B. burgdorferi* sensu stricto. W celu identyfikacji patogenu wykorzystuje się rekombinowane liniowe peptydy sąsiadujące z sekwencją głównego antygenu lub syntetyczne antygeny znakowane fluorescencyjnie. Dzięki takiemu rozwiązaniu, dokonuje się szerokiej identyfikacji immunodominujących epitopów IgG oraz IgM wytwarzanych w odpowiedzi na infekcję. Metoda zapewnia większą czułość, brak reakcji krzyżowych oraz diagnostykę różnicową niespotykaną jak dotąd [13]. Analizę obecności przeciwciał przeciw krętkowi dokonuje się poprzez skaner mikromacierzy dokonujący pomiaru intensywności fluorescencji odpowiednich sond dla IgG oraz IgM [2].

2.4. Chemiluminescencyjny system Liaison

Immunologiczna w pełni zautomatyzowana, dwustopniowa technika oparta na technologii chemiluminescencji „Flash" z paramagnetyczną mikrocząsteczkową fazą stałą. Test wykrywa obecne przeciwciała skierowane przeciwko krętkowi za pośrednictwem rekombinowanych antygenów VlsE pochodzących od referencyjnych szczepów. Rekombinowane VlsE są powlekane stałymi cząstkami paramagnetycznymi znajdującymi się w fazie stałej [14]. Technika ta jest dedykowana do analizy próbek o małych objętościach. W celu analiz badana surowica wraz z odczynnikami i paramagnetykami jest automatycznie wprowadzana do modułu reakcyjnego aparatu. Kolejno, następuje etap inkubacji, przemywania oraz wiązania z monoklonalnymi

przeciwciałami anty-IgG oraz anty-IgM sprzężonymi z pochodną izoluminolu, reagującą z immunoglobulinami związanymi z cząsteczkami paramagnetycznymi [14]. Ostatnim etapem jest wywołanie reakcji chemiluminescencji przez dodanie odczynnika inicjującego. Analiza ilościowa przeciwciał jest prowadzona przez pomiar sygnału świetlnego przedstawianego jako jednostki światła [15]. Otrzymane wyniki są przedstawiane jako wartości indeksu:

- 0.9 – ujemne;
- 0.9-1.1 – niejednoznaczne;
- 1.1 – dodatnie [14].

3. Bezpośrednie techniki detekcji *B. burgdorferi*

Techniki bezpośrednie opierają się na analizach DNA lub białek patogenu dostarczając dowody na obecność aktywnej lub nieaktywnej postaci czynnika chorobotwórczego. Wiadomo, że bezpośrednie techniki mogą wykryć znacznie szybciej infekcję w stosunku do pośrednich metod [16] jednakże ograniczeniem dla ich czułości jest mała ilość krążących bakterii w płynach ustrojowych, tkankach oraz pleomorfizm *B. burgdorferi,* który znacząco utrudnia detekcję próbek klinicznych [17]. Dotychczas żaden z bezpośrednich testów diagnostycznych w detekcji boreliozy nie został zatwierdzony [4].

3.1. PCR

Konwencjonalna metoda łańcuchowej reakcji polimerazy okazuje się być mało czułą oraz mało specyficzną [18] metodą w detekcji krętka znajdującą swoje jedyne zastosowanie do analiz biopsji skóry [19]. W celu zwiększenia jej czułości stosuje się niespecyficzne warianty PCR charakteryzujące się większą specyficznością oraz możliwością wzbogacenia [3], co umożliwia prowadzenie badań nawet w próbkach o małej objętości. Metoda ta niestety nie jest w stanie określić czy patogen znajduje się w formie aktywnej, czy nieaktywnej [3]. Głównym celem dla konwencjonalnego PCR są geny flaB, recA, ospA, hbb, groEL, 16S rDNA oraz rrs-rtlA w genomie *B. burgdorferi* [20], których produkty są analizowane standardowo w żelu agarozowym wybarwionym np. bromkiem etydyny.

3.1.1. Real-Time PCR

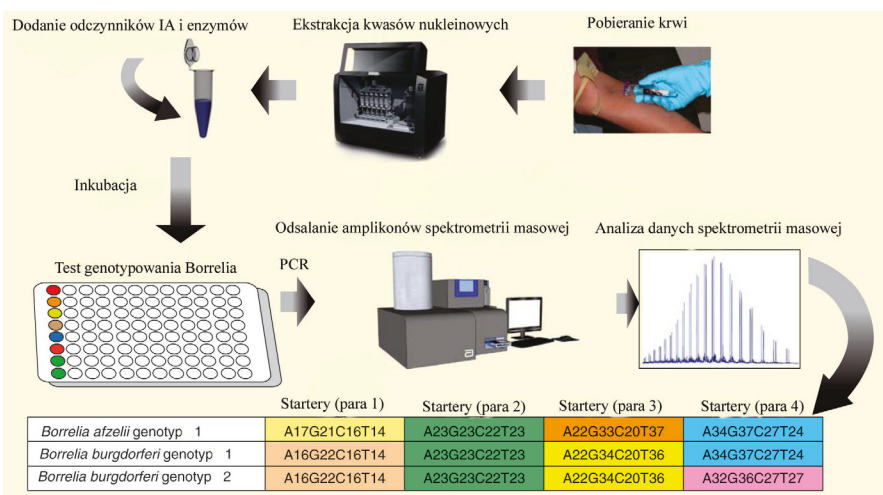
Amplifikacja w czasie rzeczywistym (RT-PCR) zwykle wykorzystuje hybrydyzację sond molekularnych z chromosomalnymi lub plazmidowymi genami krętka [19]. Metoda oparta jest na dwustopniowym algorytmie multipleksowego RT-PCR, który wykrywa infekcję na względnie wczesnym etapie. Metodę prowadzi się w dwóch etapach, pierwszy dupleksowy etap wykorzystuje sondę ukierunkowaną na odpowiedni gen np. flaB oraz na wewnętrzną kontrolę [18], którą może być gen β-aktyny pozyskany z DNA próbek klinicznych. Pozytywne próbki amplifikacji są następnie poddawane tetrapleksowej analizie RT-PCR specyficznie ukierunkowanej na gen flaB [21]. Ważne jest, aby w teście zawrzeć kontrolę negatywną, która eliminuje możliwość wystąpienia fałszywie negatywnych wyników generowanych przez reakcje krzyżowe oraz kontrolę pozytywną wykorzystującą referencyjne szczepy w celu określenia specyficzności wyniku. Detekcję boreliozy dokonuje się przez zmierzenie intensywności fluorescencji, która wykazuje obecność *Borrelia* [21].

3.1.2. Nested-PCR

Zagnieżdżony PCR jest przesiewowym narzędziem wykorzystywanym do identyfikacji DNA krętka poprzez amplifikacje unikatowych genów za pomocą zewnętrznych i wewnętrznych starterów. W celu zwiększenia czułości nPCR wykorzystuje się amplifikację zmiennych regionów wewnętrznych genów flagB oraz ospA [22]. Analizę rozpoczyna się przez ekstrakcję DNA, a następnie PCR, w którym startery skierowane są na specyficzne loci Borrelia. Następny „wewnętrzny" cykl PCR wykorzystuje amplikony (wstępnego PCR) w celu otrzymania mniejszej ilości produktów wewnętrznej amplifikacji genu [22]. W celu rozdziału amplikonów przeprowadza się elektoforezę w żelu agarozowym barwionym np. bromkiem etydyny. Wizualną ocenę prążków zwykle prowadzi się w transiluminatorze [23]. Ważnym aspektem w analizach nPCR jest zachowanie zasad sterylnej pracy, gdyż jest to technika wysoce podatna na zanieczyszczenia [24].

3.1.3. IA/PCR/ESI-MS

Innowacyjna metoda, dzięki której, analizie można poddać całą krew, ekstrakt DNA z tkanki, płynu mózgowo-rdzeniowego, surowicy, osocza i/lub płynu maziowego [16]. Zasada analizy (rys. 2), opiera się na wykryciu oraz zidentyfikowaniu DNA za pośrednictwem szerokopasmowego izotermicznego IA/PCR/ESI-MS który ukierunkowany jest na amplifikację wielu unikatowych miejsc w genomie krętka. Startery zwykle celują w sekwencje genów gyrB, rplB, rpoC, leuS, flaB, ospC, hbb [4]. Po zakończeniu reakcji izotermicznego wzbogacania (IA), oznacza się masy amplikonów za pomocą zautomatyzowanej spektrometrii mas z jonizacją wykorzystującą elektrorozpylanie [16]. Każdy z amplikonów jest różnicowany na podstawie różnicy mas oraz liczby par zasad w cząsteczce DNA. Pochodzenie amplikonów jest ustalane za pośrednictwem bazy danych.



Rysunek 2. Procedura detekcji B. burgdorferi z pełnej krwi obwodowej metodą IA/PCR/ESI-MS. Zmodyfikowane za: [4]

3.1.4. LAMP

Wysoce specyficzny test LAMP oparty jest na izotermicznej amplifikacji unikatowych genów Borrelia prowadzonej za pośrednictwem pętli. Technikę dzieli się na dwa etapy, w pierwszym z nich reakcję prowadzi się w specyficznej mieszaninie reakcyjnej, w której znajduje się analizowany DNA. Reakcja LAMP zwykle jest prowadzona w turbidymetrze, 63°C, przez 60 minut, a następnie 80°C, przez 5 minut w celu zakończenia reakcji [20]. Przebieg reakcji możliwy jest do oceny gołym okiem, jako wzrost zmętnienia mieszaniny [20]. Po etapie wzmocnienia LAMP, prowadzi się standardową reakcję PCR z odpowiednio rozcieńczonymi produktami. Analizę amplikonów prowadzi się z wykorzystaniem elektroforezy w żelu agarozowym oraz wizualizację w transiluminatorze UV [25].

3.1.5. RPA

Metoda wykorzystuje izotermiczne wykrywanie amplifikacji rekombinowanej polimerazy (RPA). Rekombinowana polimeraza przeprowadza amplifikację sekwencji specyficznego i unikatowego genu recA B. burgdorferi, oflankowanego specyficznymi starterami [26]. RPA lokalizuje sekwencje homologiczne w DNA przez połączenie rekombinazy z kompleksem białko-DNA w celu powielenia docelowej sekwencji. Uzyskane amplikony można wykryć za pomocą testów paskowych już po upływie 5 minut.

3.1.6. LTT-MELISA

Jest to ulepszona wersja techniki opracowanej w latach 80, która wykorzystuje transformowane limfocyty (LTT). Większa czułość LTT-MELISA wynika z użycia w reakcji większej ilości immunostymulowanych komórek pamięci oraz wysoce specyficznych rekombinowanych antygenów wszystkich trzech gatunków Borrelia [27]. Test LTT nazywany jest także testem proliferacji limfocytów, ponieważ w obecności rekombinowanych antygenów białkowych komórki pamięci CD4 + T wykazują proliferację [28]. Detekcja patogenu polega na izolacji jednojądrzastych komórek krwi obwodowej (PBMC) pacjenta. Następnie wprowadzeniu ich do płytek, których dołki opłaszczone są rekombinowanymi antygenami. Tak przygotowane płytki inkubuje się 5 dni w 37°C z 5% CO_2 [27]. Po inkubacji komórki traktuje się metylo-H-tymidyną. Wyniki uzyskujemy poprzez pomiar radioaktywności w ciekłym liczniku scyntylacyjnym [27], której wartości dla każdego antygenu prezentowane są jako wskaźnik stymulacji (SI; stosunek cpm hodowli z antygenem testowym w/o) [28].

3.1.7. Sekwencjonowanie nowej generacji (NGS)

Technika inaczej nazywana sekwencjonowaniem o wysokiej przepustowości (HTS), której celem jest analiza wysoko zróżnicowanego genomowego DNA B. burgdorferi [3]. Procedura obejmuje ekstrakcję DNA, PCR oraz automatyczne sekwencjonowanie. Metoda umożliwia dużą rozdzielczość konserwatywnych regionów genomu, charakterystycznych dla Borrelia. Technika jest rekomendowana głównie dla analiz surowic [3].

4. Porównanie pośrednich oraz bezpośrednich technik diagnostycznych w detekcji boreliozy

Tabela 1. Porównanie pośrednich technik diagnostycznych w detekcji boreliozy

Technika	Czułość [%]	Czas	Złożoność testu	Detekcja boreliozy w stadium
ELISA i Western Blot	96	2-14 dni	Tak	Późnym
mChip-Ld	80-100	15 minut	Nie	Późnym
TBD-Serochip	Brak danych	8 godzin	Nie	Późnym
Chemiluminescencyjny system Liaison	70	1 godzina	Tak	Późnym

Źródło: [6, 8, 9, 11, 13, 14]

Tabela 2. Porównanie pośrednich technik diagnostycznych w detekcji boreliozy

Technika	Czułość [%]	Czas	Złożoność testu	Detekcja boreliozy w stadium
Konwencjonalny PCR	12-62	14 dni	Nie	Wczesnym
Real Time PCR	78	14 dni	Nie	Wczesnym
Nested PCR	47	10 dni	Nie	Wczesnym
IA/PCR/ESI-MS	67	8 godzin	Tak	Wczesnym
LAMP	32	60 minut	Nie	Wczesnym
RPA	47-78	30 minut	Tak	Wczesnym
LTT-MELISA	92	10 dni	Tak	Wczesnym
NGS	99,5	14-28 dni	Tak	Wczesnym

Źródło: [19, 22, 24, 26, 27, 29, 30]

5. Wady i zalety pośrednich i bezpośrednich technik diagnostycznych w detekcji krętka *B. burgdorferi*

Tabela 3. Zestawienie wad i zalet pośrednich i bezpośrednich technik wykorzystywanych do detekcji boreliozy

Techniki pośrednie		Techniki bezpośrednie	
Zalety	Wady	Zalety	Wady
Jedyny „złoty standard" w detekcji boreliozy	Zdolność wykrycia boreliozy w późnym stadium	Zdolność wykrycia boreliozy we wczesnym stadium	Możliwość generowania fałszywie negatywnych wyników
Wysoka czułość, specyficzność detekcji dla surowic pacjenta	Długi czas analiz	Optymalny czas analiz	Kosztowne, pracochłonne, czasochłonne
Testy umożliwiają badanie jednocześnie dużej liczby próbek	Kosztowne, pracochłonne, czasochłonne	Analizy mogą zostać wykonane na bardzo małej objętości próbki	Wykrywanie próbek pozytywnych serotypowo nawet po długim czasie leczenia
Uniwersalność testu zapewniona przez rekombinowane antygeny	Analizy wymagają dużej ilości próbki pacjenta	Umożliwiają genotypowanie szczepów *B. burgdorferi*	Złożoność metod może znacząco wpłynąć na wynik
Ściśle określone parametry podczas interpretacji wyników	Możliwość wystąpienia reakcji krzyżowych i generowania fałszywie pozytywnych wyników	Stanowią wskaźnik skuteczności leczenia	Analizy wymagają kosztownego sprzętu
Umożliwiają odróżnienie infekcji trwającej krótko od infekcji trwającej długo	Brak standaryzacji w podawanych wynikach	Badanie patogenów z endemicznych obszarów	Prowadzenie analiz wymaga specjalistycznej wiedzy

Źródło: Opracowanie własne

6. Podsumowanie

Dany rozdział stanowi przegląd współcześnie istniejących metod, które są lub mogą być wykorzystywane w detekcji boreliozy. Należy zaznaczyć, że praca ta nie jest wynikiem prowadzonych badań przez autora, dlatego przedstawione w niej wnioski oraz rozwiązania metodyczne stanowią podsumowanie tych, które są opisywane we współczesnej literaturze. Rosnąca liczba zachorowań stanowi mechanizm napędzający do opracowania skutecznych rozwiązań w detekcji boreliozy. Jednakże pomimo wzrostu

liczby innowacyjnych technik diagnozy nadal nie posiadamy technik spełniających nasze wymagania, a zalecany algorytm będący standardem w diagnostyce *B. burgdorferi* jest obarczony wieloma wadami. Stąd istnieje ogromna potrzeba opracowania metody o stu procentowej specyficzności i czułości, wykrywającej jedynie aktywną infekcję, której wynik uzyskiwany będzie w krótkim czasie, najlepiej przyłóżkowo. Jak już wiadomo, kluczowym elementem podczas detekcji boreliozy jest zapewnienie maksymalnej skuteczności zastosowanej metody. Oczekiwana skuteczność metody może być zatem uzyskana poprzez redukcję etapów testu, które niosą ze sobą ryzyko kontaminacji. Przykładem takiego uproszczenia może być modyfikacja obecnie stosowanego „złotego standardu" w detekcji *B. burgdorferi*, podczas którego etap Western Blot zastąpiony jest nowymi, mniej skomplikowanymi, szybszymi oraz wysoce swoistymi technikami np. techniką mChip-Ld. Bardzo ciekawym podejściem wykrycia *B. burgdorferi* jest również izolacja kleszcza, którego po ukąszeniu „zabezpieczamy" w domowej lodówce. Następnie, dzięki zbadaniu kleszcza pod kątem nosicielstwa i otrzymaniu negatywnego wyniku, jesteśmy w stanie (ze stu procentową pewnością) odrzucić możliwość wystąpienia choroby. Intrygujący jest również fakt, że obecnie opracowywane metody detekcji boreliozy odrzucają metody serotypowe, oparte na wykrywaniu specyficznych przeciwciał IgG, IgM (m.in. przez długi czas potrzebny na ich wytworzenie przez organizm). Dlatego, coraz więcej dowodów wskazuje że przyszłościowa detekcja bakterii będzie opierała się na wykryciu w łatwo dostępnej próbce (np. moczu), drobnocząsteczkowych metabolitów tej bakterii. Ze względu na fakt, że próbki moczu mogą być łatwo pobrane, możliwe jest stworzenie tanich i specyficznych pasków testowych, ukierunkowanych na wykrywanie metabolitów *B. burgdorferi*. Takie rozwiązanie mogłoby znacząco przyspieszyć wykrycie wczesnej boreliozy. Paski testowe również mogłyby być dostępne w gabinetach lekarskich lub aptekach, umożliwiając tym samym możliwość wykonania samodzielnej kontroli. Jednakże, aby wytworzyć skuteczną metodę wykrywającą metabolity *B. burgdorferi* poprzez paski testowe, muszą zostać przeprowadzone dalsze badania pogłębiające wiedzę na temat specyficznych metabolitów bakterii, które mogłyby stać się biomarkerami infekcji. Należy podkreślić także, że nowoczesna technika wykrywająca boreliozę powinna przede wszystkim opierać się na wyeliminowaniu wad (wymienionych w tabeli 3), które znacząco zmniejszają skuteczność obecnie stosowanych technik jej detekcji.

Podziękowania

Szczególnie pragnę podziękować za pomoc w tworzeniu rozdziału dr inż. Jennifer Mytych.

Literatura:

1. Tilly K., Rosa P.A., Stewart P.E., *Biology of Infection with Borrelia burgdorferi*, Infectious Disease Clinics of North America, t. 22, nr 2, s. 217-234, cze. 2008, doi: 10.1016/j.idc.2007.12.013.
2. Marques A.R., *Laboratory Diagnosis of Lyme Disease*, Infectious Disease Clinics of North America, t. 29, nr 2, s. 295-307, cze. 2015, doi: 10.1016/j.idc.2015.02.005.
3. Schutzer S.E. i in., *Direct Diagnostic Tests for Lyme Disease*, Clinical Infectious Diseases, t. 68, nr 6, s. 1052-1057, mar. 2019, doi: 10.1093/cid/ciy614.
4. Mosel M.R. i in., *Molecular Testing of Serial Blood Specimens from Patients with Early Lyme Disease during Treatment Reveals Changing Coinfection with Mixtures of Borrelia*

burgdorferi Genotypes, Antimicrob Agents Chemother, t. 63, nr 7, s. e00237-19, /aac/63/7/AAC.00237-19.atom, kwi. 2019, doi: 10.1128/AAC.00237-19.
5. Wormser G.P. i in., *Evaluation of a sequential enzyme immunoassay testing algorithm for Lyme disease demonstrates lack of test independence but high diagnostic specificity*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, t. 91, nr 3, s. 217-219, lip. 2018, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2018.02.006.
6. C6-Lyme-Package-Insert.-CF-E352-811.pdf. Udostępniono: maj 30, 2020. [Online]. Dostępne na: http://www.oxfordimmunotec.com/international/wp-content/uploads/sites/3/C6-Lyme-Package-Insert.-CF-E352-811.pdf.
7. Vojdani A., Hebroni F., Raphael Y., Erde J., Raxlen B., *Novel Diagnosis of Lyme Disease: Potential for CAM Intervention*, Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, t. 6, nr 3, s. 283-295, 2009, doi: 10.1093/ecam/nem138.
8. Wormser G.P., Levin A., Soman S., Adenikinju O., Longo M.V., Branda J.A., *Comparative Cost-Effectiveness of Two-Tiered Testing Strategies for Serodiagnosis of Lyme Disease with Noncutaneous Manifestations*, J Clin Microbiol, t. 51, nr 12, s. 4045-4049, grudz. 2013, doi: 10.1128/JCM.01853-13.
9. Liu S., Cruz I.D., Ramos C.C., Taleon P., Ramasamy R., Shah J., *Pilot Study of Immunoblots with Recombinant Borrelia burgdorferi Antigens for Laboratory Diagnosis of Lyme Disease*, Healthcare, t. 6, nr 3, s. 99, wrz. 2018, doi: 10.3390/healthcare6030099.
10. Evans R., Mavin S., McDonagh S., Chatterton J.M.W., Milner R., Ho-Yen D.O., *More specific bands in the IgG western blot in sera from Scottish patients with suspected Lyme borreliosis*, Journal of Clinical Pathology, t. 63, nr 8, s. 719-721, sie. 2010, doi: 10.1136/jcp.2010.076307.
11. Arumugam S. i in., *A Multiplexed Serologic Test for Diagnosis of Lyme Disease for Point-of-Care Use*, J Clin Microbiol, t. 57, nr 12, s. e01142-19, /jcm/57/12/JCM.01142-19.atom, paź. 2019, doi: 10.1128/JCM.01142-19.
12. Nayak S. i in., *Microfluidics-based point-of-care test for serodiagnosis of Lyme Disease*, Sci Rep, t. 6, nr 1, s. 35069, grudz. 2016, doi: 10.1038/srep35069.
13. Tokarz R. i in., *A multiplex serologic platform for diagnosis of tick-borne diseases*, Sci Rep, t. 8, nr 1, s. 3158, grudz. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-21349-2.
14. Ledue T.B., Collins M.F., Young J., Schriefer M.E., *Evaluation of the Recombinant VlsE-Based Liaison Chemiluminescence Immunoassay for Detection of Borrelia burgdorferi and Diagnosis of Lyme Disease*, CVI, t. 15, nr 12, s. 1796-1804, grudz. 2008, doi: 10.1128/CVI.00195-08.
15. Busson L. i in., *Evaluation of commercial screening tests and blot assays for the diagnosis of Lyme borreliosis*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, t. 73, nr 3, s. 246-251, lip. 2012, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2012.04.001.
16. Eshoo M.W. i in., *Direct Molecular Detection and Genotyping of Borrelia burgdorferi from Whole Blood of Patients with Early Lyme Disease*, PLoS ONE, t. 7, nr 5, s. e36825, maj 2012, doi: 10.1371/journal.pone.0036825.
17. Schwarzbach A., Herranen A., Gilbert L., Meriläinen L., *Morphological and biochemical features of Borrelia burgdorferi pleomorphic forms*, Microbiology, t. 161, nr 3, s. 516-527, mar. 2015, doi: 10.1099/mic.0.000027.
18. Dumler J.S., *Molecular Diagnosis of Lyme Disease: Review and Meta-analysis*, Molecular Diagnosis, t. 6, nr 1, s. 1-11, 2001, doi: 10.2165/00066982-200106010-00001.
19. Eshoo M.W., Schutzer S.E., Crowder C.D., Carolan H.E., Ecker D.J., *Achieving molecular diagnostics for Lyme disease*, Expert Review of Molecular Diagnostics, t. 13, nr 8, s. 875–883, lis. 2013, doi: 10.1586/14737159.2013.850418.
20. *Combination of Loop-Mediated Isothermal Amplification Assay and Nested PCR for Detection of Borrelia Burgdorferi Sensu Lato in Human Serum Samples – PubMed*, https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25966759/?from_term=Borrelia+burgdorferi+LAMP&from_filter=years.2011-2020&from_pos=2 (udostępniono cze. 02, 2020).
21. Nunes M., Parreira R., Carreira T., Inácio J., Vieira M.L., *Development and evaluation of a two-step multiplex TaqMan real-time PCR assay for detection/quantification of different*

genospecies of Borrelia burgdorferi sensu lato, Ticks Tick Borne Dis, t. 9, nr 2, s. 176-182, 2018, doi: 10.1016/j.ttbdis.2017.09.001.
22. Wills M.K.B., Kirby A.M., Lloyd V.K., *Detecting the Lyme Disease Spirochete, Borrelia Burgdorferi, in Ticks Using Nested PCR*, JoVE, nr 132, s. 56471, luty 2018, doi: 10.3791/56471.
23. Socoloski S.N.G. i in., *Epidemiological investigation of Borrelia burgdorferi in horses in the municipality of Sinop-MT*, Brazil, Trop Anim Health Prod, t. 50, nr 4, s. 831-836, kwi. 2018, doi: 10.1007/s11250-017-1504-4.
24. Sroka-Oleksiak A., Ufir K., Salamon D., Bulanda M., Gosiewski T., *Nested-PCR real time as alternative molecular tool for detection of Borrelia burgdorferi compared to the classical serological diagnosis of the blood*, Med Dosw Mikrobiol, t. 68, nr 1, s. 47-56, 2016.
25. Yang J. i in., *Development and Application of a Loop-mediated Isothermal Amplification Assay for Rapid Detection of Borrelia burgdorferi s. l. in Ticks: LAMP for Detection of Borrelia sp*, Transboundary and Emerging Diseases, t. 60, nr 3, s. 238–244, cze. 2013, doi: 10.1111/j.1865-1682.2012.01335.x.
26. Liu W., Liu H.-X., Zhang L., Hou X.-X., Wan K.-L., Hao Q., *A Novel Isothermal Assay of Borrelia burgdorferi by Recombinase Polymerase Amplification with Lateral Flow Detection,* IJMS, t. 17, nr 8, s. 1250, sie. 2016, doi: 10.3390/ijms17081250.
27. Valentine-Thon E., Ilsemann K., Sandkamp M., *A novel lymphocyte transformation test (LTT-MELISA®) for Lyme borreliosis*, Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, t. 57, nr 1, s. 27-34, sty. 2007, doi: 10.1016/j.diagmicrobio.2006.06.008.
28. von Baehr V., Doebis C., Volk H.-D., von Baehr R., *The Lymphocyte Transformation Test for Borrelia Detects Active Lyme Borreliosis and Verifies Effective Antibiotic Treatment*, Open Neurol J, t. 6, s. 104-112, paź. 2012, doi: 10.2174/1874205X01206010104.

Nowoczesne techniki diagnostyczne w detekcji boreliozy

Streszczenie

Borelioza jest chorobą, której ilość zachorowań na świecie masowo wzrasta z roku na rok. Chorobę wywołują bakterie z klasy krętków *Borrelia burgdorferi*, które przenoszone są na człowieka przez kleszcze z rodzaju *Ixodes*. Zakażenie krętkiem często występuje bezobjawowo czego przyczyną jest złożoność genetyczna bakterii umożliwiająca specyficzną zdolność „omijania" rozpoznawania antygenów *B. burgdorferi* przez układ odpornościowy gospodarza. Nieleczona choroba boreliozy może mieć poważne nieodwracalne skutki, dlatego istotną dla skutecznej antybiotykoterapii jest szybka i wiarygodna diagnoza. Obecne techniki wykorzystywane do detekcji *B. burgdorferi* dzielimy na pośrednie (ELISA, Western Blot, mChip-Ld, TBD-Serochip) oraz bezpośrednie (PCR, IA/PCR/ ESI-MS, LAMP, chemiluminescencyjny system Liaison, RPA, LTT – MELISA, NGS). Dla zapewnienia większej czułości metod stosuje się nawet ich kombinację np. ELISA, Western Blot. Niestety mimo ogromnego postępu w technikach diagnostycznych nadal brakuje „złotej metody" umożliwiającej detekcję krętka w organizmie gospodarza tuż po ukąszeniu kleszcza. W niniejszej pracy dokonano zbiorczego porównania dotychczasowych technik diagnostycznych pod względem m.in. ich czułości, specyficzności, czy też szybkości wykrycia krętka od momentu ukąszenia kleszcza. Podsumowanie takie może posłużyć jako „drogowskaz", który nakieruje badaczy, czytelników na wizję przyszłościowej „złotej metody" diagnozy boreliozy. Stworzone zestawienie będzie także pełniło funkcję jasnego i przejrzystego rozgraniczenia zalet oraz wad, jakie charakteryzują wymienione techniki detekcji.

Słowa kluczowe: *Borrelia burgdorferi*, borelioza, nowoczesne techniki diagnostyczne

Novel diagnostic techniques in Lyme disease detection

Abstract

The incidence of Lyme disease has increased dramatically over the past few years. The disease is caused by bacteria from the *Borrelia burgdorferi* species, which are transmitted to humans by ticks of the *Ixodes* genus. The spirochete infection is often asymptomatic due to the genetic complexity of the bacteria enabling the specific ability to „bypass" recognition of *B. burgdorferi* antigens by the host's immune system. Untreated Lyme disease can have serious irreversible effects, which is why rapid and reliable diagnosis is essential for effective antibiotic therapy. The current techniques used for the detection of *B. burgdorferi* are divided into indirect (ELISA, Western Blot, mChip-Ld, TB-Serochip) and direct (PCR, IA/PCR/ESI-MS, LAMP, chemiluminescent Liaison system, RPA, LTT-MELISA, NGS). To ensure greater sensitivity of the methods applied, even a combination of them is used, e.g. ELISA, Western Blot. Unfortunately, despite the enormous progress in diagnostic techniques, there is still no „golden method" enabling the detection of spirochetes in the host's body right after a tick bite. This work presents a comprehensive comparison of current diagnostic techniques in terms of, among others their sensitivity, specificity, or time of detection of the spirochete since the tick bite. Such a summary can be used as a „signpost" which directs researchers and readers to the vision of the future „golden method" of Lyme disease diagnosis. The created combination will also play the pivotal role of a clear and transparent demarcation of the advantages and disadvantages of these detection techniques.

Keywords: *Borrelia burgdorferi*, Lyme disease, novel diagnostic techniques

Anna Szuba-Trznadel[1]

Ocena wpływu wybranych dodatków paszowych na ograniczanie występowania *Lawsonii intracellularis* w stadach świń

1. Wprowadzenie

Na fermach świń coraz częściej odnotowuje się występowanie bakterii *Lawsonia intracellularis*. Prowadzone badania epidemiologiczne wskazują na dynamiczny wzrost infekcji. Szacuje się, że nawet 90% stad świń w Europie jest zakażonych tą bakterią (tab. 1) [1-2]. *L. intracellularis* jest odpowiedzialna za obniżenie efektywności chowu [3-6]. Straty ekonomiczne wynikają przede wszystkim z występowania u świń adenomatozy jelitowej (PPE) lub ostrej krwotocznej enteropatii (PHE). Głównymi objawami chorób, wywołanych przez *L. intracellularis*, jest biegunka, ale w postaci przewlekłej często przebieg jest nietypowy i wówczas odnotowywane są zmniejszenie pobrania paszy oraz obniżenie przyrostów masy ciała [7-8].

Tabela 1. Występowanie zakażeń bakterią *Lawsonia intracellularis* w europejskich stadach świń wg różnych autorów

Kraj	Rok	% występowania zakażeń w monitorowanych stadach świń	Źródło
Norwegia	2000	37,6%	[9]
Niemcy	2000	ponad 80%	[10]
Dania	1998	75%	[11]
	2001	ok. 94%	
Anglia	2001	ok. 94%	[2]
Polska	2001	74,1%	[12]
	2003	67,6% (przeciwciała przeciwko *L. intracellularis* oznaczono w 92% badanych stad świń)	[10]

W stadach świń drogą infekcji są zakażenia doustne. Osobniki zdrowe ulegają infekcji poprzez kontakt z odchodami lub przez styczność ze skontaminowanymi przedmiotami i sprzętem wielokrotnego użycia, które nie zostały właściwie umyte i zdezynfekowane przez obsługę [13-14]. Udowodniono również rolę gryzoni i owadów jako nosicieli tej bakterii pomiędzy stadami świń [15]. Zatem, objawy choroby mogą pojawić się w wyniku zakażenia, ale również często mogą być związane ze zbyt dużym zagęszczeniem zwierząt w kojcu. Ponadto zakażeniom sprzyja brak higieny, regularnej dezynfekcji kojców oraz nieprzestrzeganie zasady: całe pomieszczenie pełne – całe pomieszczenie puste (cpp-cpp) [16-17]. Zwłaszcza że bakteria ta jest wydalana w dużych ilościach z kałem, gdzie może utrzymywać się do 14 dni [18-19]. Infekcje bakteryjne przyczyniają się do selekcji mikroflory jelitowej [20]. Natomiast niekorzystny mikrobiom ma wpływ na obniżenie tempa wzrostu zwierząt, pogorszenie

[1] Katedra Żywienia Zwierząt i Paszoznawstwa, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu.

wyników produkcyjnych i może prowadzić do wystąpienia PHE. Czasem odnotowuje się przypadki nagłej śmierci. W badaniach Borewicza i in. [21] stwierdzono interakcję pomiędzy *L. intracellularis* a *Salmonellą enterica*. Świnie zakażone *L. intracellularis* wykazywały zwiększoną podatność na zakażenia salmonellami.

Mając na uwadze intensywność chowu świń poszukuje się nowych rozwiązań, które mogłyby zostać wykorzystane w ograniczaniu występowania *Lawsonia intracellularis*. Celem pracy jest przegląd wyników badań nad zastosowaniem dodatków paszowych, które poprzez poprawę zdrowotności zwierząt pozwolą również zwiększyć skuteczność chowu świń.

2. Charakterystyka postaci klinicznych chorób wywołanych przez *L. intracelluaris*

L. intracellularis jest Gram-ujemną bakterią (długość komórki wynosi 1,25-1,75 μm; a szerokość 0,25-0,43 μm). Na jej powierzchni nie występują rzęski i fimbrie. *L. intracellularis* nie ma zdolności wytwarzania przetrwalników. Jej obecność stwierdzana jest w cytoplazmie enterocytów. Namnażanie się bakterii ma miejsce wyłącznie w dzielących się komórkach nabłonka błony śluzowej krypt jelitowych (w jelicie biodrowym i okrężnicy) [20, 22]. Dlatego podawanie leków hamujących wzrost komórek również ogranicza występowanie *L. intracellularis*. Po eliminacji bakterii błona śluzowa jelit regeneruje się i wraca do stanu prawidłowego [16].

Postać ostrą obserwuje się najczęściej u tuczników o masie ciała 50-100 kg. Charakterystycznym objawem jest biegunka i kał o zabarwieniu ciemnoczerwonym. Świnie tracą znacząco na masie ciała, odnotowywane są także nagłe ich padnięcia (w okresie 2-7 dni od pierwszych objawów biegunkowych). Śmiertelność jest wysoka i może wynosić 50-90% [16, 17].

Przewlekła postać PPE może występować u świń w różnym wieku (najczęściej między 6. a 20. tygodniem życia). Charakteryzuje się łagodnym przebiegiem biegunki, co prowadzi do zahamowania przyrostów masy ciała zwierząt. W wyniku długotrwałych biegunek śmiertelność nie przekracza 5%. Przewleka postać choroby rzutuje niekorzystnie na ekonomiczny efekt tuczu. Producenci ponoszą istotne straty w wyniku przedłużającego się tuczu świń i zahamowania przyrostów masy ciała zwierząt [8, 17].

Podczas sekcji świń, padłych w wyniku ostrej postaci choroby, stwierdzano zgrubienie ściany jelita biodrowego, czasem obrzęki i wybroczyny. Natomiast w postaci łagodnej PPE charakterystyczne są zgrubienia występujące w odcinkach jelita cienkiego i/lub jelita grubego (głównie w górnym odcinku okrężnicy) [16-17, 22].

W wyniku zakażenia *L. intracellularis* krypty jelitowe są zazwyczaj powiększone i wydłużone. W nabłonku przeważają niedojrzałe komórki. Zazwyczaj po trzech tygodniach od zakażenia w cytoplazmie dzielących się komórek nabłonka namnaża się bakteria *L. intracellularis*, a po 7-9 tygodniach od zakażenia uwidaczniają się zmiany zwyrodnieniowe w nabłonku jelit. Obserwuje się utratę mikrokosmków, obrzęk, wybroczyny i zgrubienia ściany jelit [16-17, 22].

3. Skuteczność dodatków paszowych w zapobieganiu i leczeniu chorób wywołanych przez *L. intracellularis*

Biegunki, występujące po odsadzeniu, są poważnym problemem na fermach świń. U prosiąt, w wyniku ostrego przebiegu biegunek, śmiertelność może sięgać powyżej

10% [23]. Najczęstszą przyczyną biegunek mogą być infekcje wywołane przez różne patogeny, w tym *L. intracellularis*, *E. coli*, *Clostridium* sp., *Salmonellę*.

Identyfikacja zakażeń wywołanych przez *L. intracellularis* jest trudna. Powszechnie wiadomo, że błędna diagnoza prowadzi do nadmiernego stosowania antybiotyków i skutkuje obniżeniem efektywności produkcji. Szybka identyfikacja zakażeń polega na wykryciu *L. intracellularis* w próbkach kału lub oznaczeniu swoistych przeciwciał w surowicy krwi. W badaniach Pejsaka i in. [24] stwierdzono obecność *L. intracellularis* w ponad 62% ferm poddanych monitoringowi. Zauważono również, że w średnich gospodarstwach (do 100 loch) odsetek zainfekowanych ferm stanowił 46,15%. Natomiast w wielkotowarowych fermach o cyklu zamkniętym (powyżej 100 loch) wyniósł 72,5% [24].

W celu ograniczania przenoszenia infekcji wśród świń zalecane jest doustne podawanie antybiotyków, preparatów leczniczych lub szczepionek [1, 5]. Antybiotyki mogą ograniczać występowanie PPE u świń. Badania potwierdziły, że linkomycyna i tylozyna najskuteczniej ograniczają zapalenia jelit wywołane przez L. intracellularis [13, 25]. Jednak antybiotyki muszą być zastosowane we wczesnej fazie infekcji. Z drugiej strony, gdy antybiotyki są podane zbyt wcześnie prosięta mogą nie wykształcić odporności czynnej przeciwko *L. intracellularis* [17]. Dodatkowo, antybiotyki mogą utracić swoją skuteczność działania wobec oporności bakterii na stosowane w preparatach substancje czynne. Powszechnie znanym zabiegiem jest również szczepienie. Badania Guedes i Gebhart [18-19] dowodzą, że stosując żywą atenuowaną szczepionkę można ograniczyć zakażenia do 9 tygodni. Wśród praktyków są jednak głosy o niewystarczającej skuteczności szczepionek, co wymusza prace nad jej ulepszaniem [26].

Inną z dróg przeciwdziałania infekcjom bakteryjnym wywołanym przez *L. intracellularis* jest stosowanie m.in. dodatków probiotycznych (zwłaszcza bakterii kwasu mlekowego), prebiotycznych i fitogenicznych do pasz. Kwas mlekowy obniża pH i wykorzystując mechanizm „konkurencyjnego wykluczenia" eliminuje *L. intracellularis*. Szczególne zainteresowanie wokół tego zagadnienia budzą również substancje czynne wyizolowane z drożdży, jak β-D-1-3/1-6-glukany. Substancje te w żywieniu młodych świń mogą przynosić szereg korzyści gospodarczych, polegających na podnoszeniu zdrowotności zwierząt, które również wykazują wyższe tempo wzrostu. Podobnie, preparaty fitogeniczne skutecznie ograniczają występowanie biegunek na tle bakteryjnym oraz poprawiają zdrowotność zwierząt.

4. Preparaty probiotyczne

Starannie dobrane szczepy bakterii probiotycznych w paszy uniemożliwiają rozwój patogennych mikroorganizmów w przewodzie pokarmowym zwierząt [27-28]. Sprzyja to utrzymaniu homeostazy środowiska wewnętrznego przewodu pokarmowego, zwiększa tolerancję organizmu na niesprzyjające bodźce zewnętrzne, poprawia przyswajalność składników pokarmowych, co przekłada się na wyższe przyrosty masy ciała zwierząt [29-30]. Bakterie probiotyczne obniżają poziom pH treści przewodu pokarmowego, zahamowując rozwój lub ograniczając wzrost bakterii chorobotwórczych. W efekcie stosowania dodatków probiotycznych odnotowano obniżenie liczby bakterii *Clostridium* sp., *E. coli*, *Salmonella* sp. w treści przewodu pokarmowego i w kale zwierząt [31]. Stąd też zmniejsza się prawdopodobieństwo

wystąpienia zachorowań i upadków zwierząt w czasie odchowu [32]. Ponadto probiotyki łagodzą straty spowodowane biegunkami, zmniejszają czas trwania biegunek, poprawiają wykorzystanie paszy oraz zwiększają dzienne przyrosty, a tym samym skracają czas trwania tuczu [33, 34], a także wspomagają układ odpornościowy [35].

Opriessning i in. [8] oraz van der Peet Schwering i in. [34], stosując preparat probiotyczny zawierający wybrane szczepy z rodzaju *Bacillus*, stwierdzili obniżenie liczby bakterii *L. intracellularis* w kale oraz poprawę konsystencji kału. Ponadto w trakcie podawania probiotyku zwierzęta nie wymagały tak częstych interwencji weterynaryjnych jak grupa kontrolna, co może wskazywać na wyższą ich zdrowotność. W badaniach przeprowadzonych przez Jørgensen i in. [33] odnotowano niższe zużycie paszy na kg przyrostu masy ciała tuczników, otrzymujących probiotyk zawierający szczepy *Bacillus* w mieszance paszowej. Uzyskane wyniki znalazły także potwierdzenie w badaniach przeprowadzonych przez van der Peet Schwering i in. [34]. Wyniki produkcyjne odnotowane we wszystkich grupach były zbliżone. Jednakże Autorzy podkreślają korzystny wpływ preparatu probiotycznego na wskaźnik konwersji paszy (FCR). W dostępnym piśmiennictwie podkreślany jest fakt ograniczania występowania biegunek przez dodatek bakterii z rodzaju *Bacillus* do paszy [36-37].

Ze względu na brak powtarzalności w zakresie uzyskiwanych wyników ocena wpływu probiotyków na ograniczanie występowania *L. intracellularis* wymaga dalszych badań. Uzyskiwane wyniki zależą głównie od zastosowanej dawki i rodzaju użytego szczepu probiotycznego, genetyki i wieku zwierząt oraz warunków środowiskowych, w których utrzymywane są świnie [38-39].

5. Preparaty prebiotyczne

Drożdże i produkty ich frakcjonowania, m.in. mannany i β-D-1-3/1-6-glukany, cieszą się od dawna dużym zainteresowaniem w żywieniu trzody chlewnej [40-42]. Wyniki badań wskazują, że zastosowanie tych substancji w żywieniu młodych świń może przynosić szereg korzyści gospodarczych polegających na usprawnianiu procesów trawienia [43-44], podnoszeniu zdrowotności zwierząt [45-46] oraz dynamizowaniu tempa wzrostu [47-48]. Stosując substancje czynne z drożdży stwierdzono także zahamowanie namnażania się bakterii *E. coli*, *Clostridium* sp., pałeczki *Salmonelli*, co ograniczyło występowanie biegunek i miało korzystny wpływ na konsystencję kału [49]. Należy przy tym dodać, że u zwierząt klinicznie zdrowych również można stwierdzić w kale wysoką koncentrację np. *E. coli* czy *Clostridium* sp. Ponadto zwierzęta, wykazujące objawy lekkiej biegunki, zawsze gorzej pobierają paszę i słabiej rosną.

β-glukany wykazują działanie zwiększające odporność organizmów na choroby. Sorocinova i in. [50], choć nie potwierdzili wzrostu liczby przeciwciał przeciwko *L. intracellularis* po zastosowaniu w żywieniu zwierząt β-glukanów, jednoznacznie wskazali na immunomodulujące właściwości tego związku. Późniejsze badania sugerują, że β-glukany podawane w paszy w połączeniu ze szczepieniem dużo silniej oddziaływały na wykształcenie odporności przeciwko *L. intracellularis* u prosiąt [51]. Wciąż zbyt mała liczba badań przeprowadzonych w tym zakresie sprawia, że brakuje rzetelnych dowodów naukowych pozwalających na stosowanie jedynie β-glukanów w ograniczaniu występowania *L. intracellularis*.

6. Preparat fitogeniczne

Substancje fitogeniczne, w tym olejki eteryczne ekstrahowane z różnych roślin, wykazują działanie antybakteryjne [52-53], przeciwutleniające [54] oraz pobudzają wzrost świń [55-56]. Podnoszą także sprawność układu jelitowo-immunologicznego (GALT), co przyczynia się do lepszego wykorzystania składników pokarmowych (w tym związków azotowych) i mineralnych obecnych w paszy. Dzięki czemu uzyskuje się poprawę wyników produkcyjnych w tuczu świń [57]. Zeng i in. [58] oraz Bartoš i in. [59], stosując dodatek olejków eterycznych, odnotowali lepsze wykorzystanie paszy, czego efektem było wyższe tempo wzrostu zwierząt. Badania przeprowadzone przez Windisch i in. [57] wskazały na bakteriobójcze właściwości olejków eterycznych. Dlatego też dodatki fitogeniczne zaliczane są do skutecznych preparatów ograniczających występowanie biegunek [60-61].

W badaniach przeprowadzonych przez Draskovica i in. [13] zastosowanie mieszaniny wyciągów z tymianku (*Thymus vulgaris*), oregano (*Origanum vulgare*), kolendry (*Coriandrum sativum*) i kasztana jadalnego (*Castanea sativia*) zredukowało w próbkach kału liczbę patogenów, w tym liczbę bakterii *L. intracellularis*. Wyniki przedstawionych badań były zgodnie również ze sformułowaniami innych badaczy [60, 62]. Papatsiros i in. [60] wskazali, że wyciąg z oregano (*Origanum vulgare*) i czosnku (*Allium sativum*) również obniżył liczebność kolonii *L. intracellularis* w przewodzie pokarmowym, a także ograniczył występowanie biegunek. Dzięki czemu uzyskano poprawę wskaźników produkcyjnych. Na postawie przeanalizowanych wyników badań można wysunąć wniosek o skutecznym działaniu dodatków fitogecznicznych w ograniczaniu biegunek wywołanych przez bakterię *L. intracellularis*.

7. Podsumowanie

Podsumowując można wskazać korzystne działanie dodatków paszowych w ograniczaniu występowania *L. intracellularis* w stadach świń. Po wprowadzeniu od 2006 roku ograniczeń w stosowaniu antybiotyków oraz biorąc pod uwagę obawy dotyczące wzrostu oporności wśród bakterii na substancje aktywne stosowane w lekach, wciąż poszukiwane są tzw. związki alternatywne. W miejsce antybiotyków zostały wprowadzone m.in. probiotyki, prebiotyki czy też preparaty fitogeniczne. Dodatki te wykazują szerokie spektrum działania, w tym przeciwbakteryjne, przeciwutleniające, a także stymulujące układ odpornościowy zwierząt. Jednakże, w celu uzyskania rzetelnych informacji na temat skuteczności ich działania konieczne są dalsze badania.

Literatura:

1. Larsen I., Hjulsager C.K., Holmc A., Olsend J.E., Nielsena S.S., Nielsen J.P., *A randomised clinical trial on the efficacy of oxytetracycline dosethrough water medication of nursery pigs on diarrhoea, faecalshedding of Lawsonia intracellularis and average daily weight gain*, Preventive Veterinary Medicine, 123, 2016, s. 52-59.
2. Bae J.K., Wieland B., Sait M., Longbottom D., Smith D.G.E., Alarcon P.,Wheelhouse N., *Risk factors associated with Lawsonia intracellularis inEnglish pig farms*, The Vetrinary Journal, 197, 2013, s. 707-711.
3. Kroll J.J., Eichmeyer M.A., Schaeffer M.L., McOrist S., Harris D.L., Roof M.B., *Lipopolysaccharide-based enzyme-linked immunosorbent assay for experimental use in detection of antibodies to Lawsonia intracellularis in pigs*, Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, 12, 2005a, s. 693-699.
4. Kroll J.J., Roof M.B., Hoffman L.J., Dickson J.S., Harris D.H., *Proliferative enteropathy: a global enteric disease of pigs caused by Lawsonia intracellularis*, Animal Health

Research Review, 6, 2005b, s. 173-197.
5. Szczotka A., Stadejek T., Żmudzki J., Nowak A., Osiński Z., Pejsak Z., *Immuno-histochemical detection of Lawsonia intracellularis in tissue sections from pigs*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 14(4), 2011, s. 531-538, DOI 10.2478/v10181-011-0079-7.
6. McOrist S., Gebhart C.J., *Proliferative enteropathy*, In: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. (eds.), 10th diseases of swine. Wiley, New York 2012, s. 811-820.
7. Paradis M.A., Gebhart C.F., Toole D., Vessie G., Winkelman N.L., Bauer S.A., Wilson J.B., McClure C.A., *Subclinical ileitis: diagnostic and performance parameters in a multi-dose mucosal challenge model*, Journal of Swine Health and Production, 20, 2012, s. 137-141.
8. Opriessnig T., Karuppannan A.K., Beckler D., Ait-Ali T., Cubas-Atienzar A., Halbur P.G., *Bacillus pumilus probiotic feed supplementation mitigates Lawsonia intracellularis shedding and lesions*, Veterinary Research, 50, 2019, 85, DOI:10.1186/s13567-019-0696-1.
9. Flø H., Bergsjø B., Grove S., *The prevalence of Lawsonia intracellularis in Norwegian swine herds*, Proc. Internat. Pig Veterinary Society, 16th Congress, Melbourne, Australia, 2000, s. 67.
10. Pławińska J., *Zakażenia Lawsonia intracellularis u świń w Polsce*, Praca doktorska, Wydział Medycyny Weterynaryjnej SGGW Warszawa 2003.
11. Stege H., Jensen T.K., Møller K., Baekbo P., Jorsal S.E., *Prevalence of intestinal pathogens in Danish finishing pig herds*, Prev. Veterinary Microbiology, 46, 2000, s. 279-292.
12. Pejsak Z., Żmudzki J., Stankevicius A., *Rozprzestrzenienie zakażeń Lawsonia intracellularis w populacji świń w Polsce*, Medycyna Weterynaryjna, 57, 2001, s. 887-889.
13. Draskovica V., Bosnjak-Neumullerb J., Vasiljevicb M., Petrujkicc B., Aleksicd N., Kukolje V., Stanimirovica Z., *Influence of phytogenic feed additive on Lawsonia intracellularis infection in pigs*, Preventive Veterinary Medicine, 151, 2018, s. 46-51.
14. Collins A., Love R.J., Pozo J., Smith S.H., McOrist S., *Studies on the ex vivo survival of Lawsonia intracellularis*, Journal of Swine Health Production, 8, 2000, s. 211-215.
15. Gabardo M.P., Sato J.P.H., Daniel A.G.S., Andrade M.R., Pereira C.E.R., Rezende T.P., Otoni L.V.A., Rezende L.A., Guedes R.M.C., *Evaluation of the involvement of mice (Mus musculus) in the epidemiology of porcine proliferative enteropathy*, Veterinary Microbiology, 205, 2017, s. 75-79.
16. Lawson G.H.K., Gebhart C.J., *Proliferative enteropathy*, Journal of Comparative Pathology, 122, 2000, s. 77-100.
17. Pławińska J., Binek M., *Lawsonia intracellularis: czynnik rozrostowego zapalenia jelit świń,* Medycyna Weterynaryjna, 62(8), 2006, s. 860-864.
18. Guedes R.M.C., Gebhard C.J., *Comparison of intestinal mucosa homogenate and pure culture of the homologous Lawsonia intracellularis isolate in reproducing proliferative enteropathy in swine*, Veterinary Microbiology, 93, 2003a, s. 159-166.
19. Guedes R.M., Gebhart C.J., *Onset and duration of fecal shedding, cellmediated and humoral immune responses in pigs after challenge with a pathogenic isolate or attenuated vaccine strain of Lawsonia intracellularis*, Veterinary Microbiology, 91, 2003b, s. 135-145.
20. Karuppannan A.K., Opriessnig T., *Lawsonia intracellularis: Revisiting the disease ecology and control of this fastidious pathogen in pigs*, Frontiers in Veterinary Science, 5, 2018, s. 181, DOI: 10.3389/fvets.2018.00181.
21. Borewicz K.A., Kim H.B., Singer R.S., Gebhart C.J., Sreevatsan S., Johnson T., Isaacson R.E., *Changes in the porcine intestinal microbiome in response to infection with Salmonella enterica and Lawsonia intracellularis*, PLoS ONE, 10, 2015, e0139106.
22. Smith D.G.E., Lawson G.H.K., *Lawsonia intracellularis: getting inside the pathogenesis of proliferative enteropathy*, Veterinary Microbiology, 82, 2001, s. 331-345.
23. Laine T.M., Lyytikäinen T., Yliaho M., Anttila M., *Risk factors for post-weaning diarrhoea on piglet producing farms in Finland*, Acta Veterinaria Scandinavica, 50, 2008, s. 21.
24. Pejsak Z., Żmudzki J., Wasak M., Porowski M., Wojciechowski J., Mirt D., *Występowanie*

zakażeń Barchyspira hyodysenteriae i Lawsonia intracellularis w krajowej populacji świń, Medycyna Weterynaryjna, 63(8), 2007, s. 994-996.
25. Visscher C., Mischok J., Sandern S., Verspohl J., Peitzmeier E.U., von dem Busche I., Kamphues J., *Spread of an experimental salmonella derby infection in antibiotic-treated orlawsonia intracellularis vaccinated piglets*, Animals, 8, 2018, s. 206-222, DOI:10.3390/ani8110206.
26. Bak H., Rathkjen P.H., *Reduced use of antimicrobials after vaccination of pigs against porcine proliferative enteropathy in a Danish SPF herd*, Acta Veterinaria Scandinavica, 51, 2009, 1.
27. Simon O., *An interdisciplinary study on the mode of action of probiotics in pigs*, Journal of Animal and Feed Sciences, 19, 2010, s. 230-243.
28. El-Banna H.A., El-Zorba H.Y., Atitta T.A., Abd Elatif A., *Effect of probiotic, prebiotic and synbiotic on broiler performance*, World Applied Science, 11, 2010, s. 388-393.
29. Wang Y., Cho J.H., Chen Y.J., Yoo J.S., Huang Y., Kim H.J., Kim I.H., *The effect of probiotic BioPlus 2B® on growth performance, dry matter and nitrogen digestability and slurry noxious gas emission in growing pigs*, Livestock Sciences, 120, 2009, s. 35-42.
30. Blavi L., Jørgensen J.N., Stein H.H., *Effects of Bacillus amyloliquefaciens and Bacillus subtilis on ileal digestibility of AA and total tract digestibility of CP and gross energy in diets fed to growing pigs*, Journal of Animal Science, 97, 2019, s. 727-734.
31. Scharek L., Altherr B.J., Tölke C., Schmidt M.F.G., *Influence of the probiotic Bacillus cereus var. toyoi on the intestinal immunity of piglets*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 120, 2007, s. 136-147.
32. Kenny M., Smidt H., Mengheri E., Miller B., *Probiotics – do they have a role in the pig industry?*, Animal, 5, 2011, s. 462-470.
33. Jørgensen J.N., Sánchez Laguna J., Millán C., Casabuena O., Gracia M.I., *Effects of a Bacillus-based probiotic and dietary energy content on the performance and nutrient digestibility of wean to finish pigs*, Animal Feed Science and Technology, 221, 2016, s. 54-61.
34. van der Peet-Schwering C.M.C., Verheijena R., Jørgensenb L., Raff L., *Effects of a mixture of Bacillus amyloliquefaciens and Bacillus subtilis on the performance of growing-finishing pigs*, Animal Feed Science and Technology, 261, 2020, s. 114409.
35. Gibson G.R., Roberfroid M.B., Editors, *Handbook of Prebiotics*, CRC Press 2008.
36. Ji J., Hu S., Zheng M., Du W., Shang Q., Li W., *Bacillus amyloliquefaciens SC06 inhibits ETEC-induced pro-inflammatory responses by suppression of MAPK signaling pathways in IPEC-1 cells and diarrhea in weaned piglets*, Livestock Science, 158, 2013, s. 206-214.
37. Zentek J., Röhe I., Cernat R., Nielsen B., *Efficacy of pre-selected bacilli as probiotic feed additives in F4+ Escherichia coli challenged post-weaning piglets*, In: The 6th Beneficial Microbes Conference: Pre – and Probiotics for Lifelong Human and Animal Health. 9-11 October. Amsterdam, The Netherlands. 2017, s. 80 (Abstract).
38. Barba-Vidal E., Martín-Orúe S.M., Castillejos L., *Review: Are we using probiotics correctly in post-weaning piglets?*, Animal, 12, 2018, s. 2489-2498.
39. Mingmongkolchai S., Panbangred W., *Bacillus probiotics: an alternative to antibiotics for livestock production*, Journal of Applied Microbiology, 124, 2018, s. 1334-1346.
40. Kim J.D., Hyun Y., Sohn K.S., Woo H.J., Kim T.J., Han In.K., *Effects of immunostimulators on growth performance and immune response in pigs weaned at 21 days of age*, Journal of Animal and Feed Sciences, 9, 2000, 2.
41. Zimmermann B., Bauer E., Mosenthin R., *Pro – and prebiotics in pig nutrition – potential modulators of gut health?*, Journal of Animal and Feed Sciences, 10, 2001, 1.
42. Lipiński K., Perwin C., Tywończuk J., Zsuńczyk Z., Wróblewska M., Łaniewska-Trokenheim Ł., Warmińska-Radyko I., *Effects of feed additives on nutrient digestibility and bacterial status of feaces in pigs*, Journal of Animal and Feed Sciences, 14, suppl. 1. 2003.
43. Fuchs B., Rząsa A., Szuba-Trznadel A., Haremza D., *Preparat drożdży piwnych podawany lochom prośnym i karmiącym jako czynnik stymulujący produkcyjność i zdrowotność*

prosiąt (in polish), Acta Scientiarum Polonorum. Zootechnica 6, 2007, s. 17-27.
44. Fuchs B., Frericks J., Szuba-Trznadel A., Ragaller V., Lira R., *The influence of products contained mannans and* β*-D-1,3/1,6-glucans on on the production and physiology results of piglets during weaning period* (in polish), Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu Nr 580. Biologia i Hodowla Zwierząt 62, 2011, s. 131-141.
45. Li J., Li D.F., Xing J.J., Cheng Z.B., Lai C.H., *Effects of β-glucan extracted from Saccharomyces cerevisiae on growth performance, and immunological and somatotropic responses of pigs challenged with Escherichia coli lipopolysaccharide*, Journal of Animal Science, 84, 2006, s. 2374-2381.
46. Szuba-Trznadel A., Rząsa A., Lira R., Fuchs B., *The influence of (1,3)-(1,6)-β-D-glucan on the production results of sows and their off springs*, Journal of Animal and Feed Science, 23 (3), 2014, s. 228-235.
47. Hahn T.W., Lohakare J.D., Lee S.L., Moon W.K., Chae B.J., *Effects of supplementation of β-glucans on growth performance, nutrient digestibility, and immunity in weanling pigs*, Journal of Animal Science, 84, 2006, s. 1422-1428.
48. Szuba-Trznadel A., Rząsa A., Lira R., Fuchs B., *Influence of application of (1,3)-(1,6)-β-D-glucans and mannans on production results of sows and piglets*, Annals of Warsaw University of Life Science – SGGW Animal Science, 56 (2), 2017, s. 311-322, DOI: 10.22630/AAS.2017.56.2.33.
49. Schierack P., Walk N., Reiter K., Weyrauch K.D., Wieler L.H., *Composition of intestinal Enterobacteriaceae populations of healthy domestic pigs*, Microbiology, 153, 2007, s. 3830-3837.
50. Soročinová J., Reichel P., MudroňováD., Novotný J., Link R., Lešková L., Smaržik M., Seidel H., Húska M., Macák V., Dobolyová S., Kovačocyová K., *Beta-glucan feeding effect on biochemical and immune responses in vaccinated and non-vaccinated piglets against proliferative enteropathy*, Acta Veterinaria – Brno, 82, 2013, s. 153-159, DOI:10.2754/avb201382020153.
51. Kovačocyová K., Reichel P., Seidel H., Brenesselová M., Kósa B., *Influence of beta-glucan and vaccination against lawsonia intracellularis on selected immune indices in weaned piglets*, Acta Veterinaria – Beograd, 64(1), 2014, s. 105-114, DOI: 10.2478/acve-2014-0011.
52. Jugl-Chizzola M., Spergser J., Schilcher F., Novak J., Bucher A., Gabler C., Hagmüller W., Zitterl-Eglseer K., *Effects of Thymus vulgaris L. as feed additive in piglets and against haemolytic E. coli in vitro*, Berliner und Munchener Tierarztliche, 118, 2004, s. 495-501.
53. Burt S., *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review*, International Journal of Food Microbiology, 94, 2004, s. 223-253.
54. Jimenez-Alvarez D., Giuffrida F., Golay P.A., Cotting C., Lardeau A., Keely B.J., *Antioxidant activity of oregano, parsley, and olive mill wastewaters in bulk oils and oil-in-water emulsions enriched in fish oil*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 56, 2008, s. 7151-7159.
55. Kroismayr A., Sehm J., Pfaffl M., Plitzner C., Foissy H., Ettle T., Mayer H., Schreiner M., Windisch W., *Effects of essential oils or Avilamycin on gut microbiology and blood parameters of weaned piglets*, Czech Journal of Animal Science, 53, 2008, s. 377-387.
56. Frankic T., Voljc M., Salobir J., Rezar V., *Use of herbs and spices and their extracts in animal nutrition*, Acta Agriculturae Slovenica, 94, 2009, s. 95-102.
57. Windisch, W., Schedle K., Plitzner C., Kroismayr A., *Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry*, Journal of Animal Science, 86, 2008, E140-E148.
58. Zeng Z., Zhang S., Wang H., Piao X., *Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review*, Journal of Animal Science and Biotechnology, 6(1), 2015, 7.
59. Bartoš P., Dolan A., Smutny L., Šistaková M., Celjak J., Šoch M., Havelka Z., *Effects of phytogenic additives on growth performance and on ammonia and greenhouse gases emissions in growing – finishing pigs*, Animal Feed Science and Technology, 211, 2016, s. 143-148.

60. Papatsiros V.G., Tzika E.D., Papaioannou D.S., Kyriakis S.C., Tassis P.D., Kyriakis C.S., *Effect of Origanum vulgaris and Allium sativum extracts for the control of proliferative enteropathy in weaning pigs*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 12, 2009, s. 407-414.
61. Nikola D., Drašković V., Stevanović J., Savić B., Lakić N., Bošnjak-Neumüller J., Stanimirović Z., *The efficacy of two phytogenic feed additives in the control of swine dysentery*, Acta Veterinaria-Beograd, 68(2), (2018), 178-189. DOI: 10.2478/acve-2018-0016.
62. França S.D.A., Machado G.D.S., Andreoli P.R., Santos J.C.B., Guedes R.M.C., *In feed macrolide Leucomycin (Leucomag 30% PR) for prevention of proliferative enteropathy in experimentally infected pigs*, Ciencia Rural, 40, 2010, s. 1378-1384.

Ocena wpływu wybranych dodatków paszowych na ograniczanie występowania *Lawsonii intracellularis* w stadach świń

Streszczenie

Mając na uwadze intensywność chowu świń poszukuje się nowych rozwiązań, które mogłyby zostać wykorzystane w ograniczaniu występowania *Lawsonia intracellularis*. Celem pracy jest przegląd wyników badań nad zastosowaniem dodatków paszowych, które poprzez poprawę zdrowotności zwierząt pozwolą również zwiększyć skuteczność chowu świń.

Lawsonia intracellularis powszechnie występuje w wielu stadach trzody chlewnej (głównie w dużych fermach), jest bakterią odpowiedzialną za obniżenie efektywności chowu. Straty ekonomiczne wynikają przede wszystkim z występowania u świń adenomatozy jelitowej (PPE) lub ostrej krwotocznej enteropatii (PHE) wywołanych przez *L. intracellularis*. Głównymi objawami jest biegunka, ale w postaci przewlekłej bardzo często przebieg jest nietypowy i wówczas odnotowywane jest obniżenie przyrostów masy ciała. Do zakażenia może dojść drogą doustną. Osobniki zdrowe ulegają infekcji poprzez kontakt z odchodami świń zakażonych *L. intracellularis*. Infekcja bakteryjna obniża tempo wzrostu zwierząt, co wpływa na wyniki produkcyjne i może prowadzić do wystąpienia PHE. Czasem odnotowuje się przypadki nagłej śmierci.

Leczenie polega na wprowadzeniu antybiotyków lub podawaniu szczepionki. Antybiotyki mogą ograniczać występowanie PPE u świń, jednak muszą być zastosowane we wczesnej fazie infekcji. Gdy antybiotyki są podane zbyt wcześnie prosięta mogą nie wykształcić odporności czynnej przeciwko *L. intracellularis*. Dodatkowo zastosowanie antybiotyków może zwiększać oporność szczepów bakteryjnych na substancję czynną. Innym zabiegiem jest szczepienie. Jednak wśród praktyków są głosy o niewystarczającej skuteczności szczepionek, co wymusza prace nad ich ulepszaniem.

Inną z dróg przeciwdziałania infekcji jest stosowanie m.in. dodatków probiotycznych (zwłaszcza bakterii kwasu mlekowego), prebiotycznych i fitogenicznych w żywieniu zwierząt. Kwas mlekowy obniża pH i wykorzystując mechanizm „konkurencyjnego wykluczenia" eliminuje *L. intracellularis*. Szczególne zainteresowanie wokół tego zagadnienia budzą substancje czynne wyizolowane z drożdży, jak β-D-1-3/1-6-glukany. Związki te w żywieniu młodych świń mogą przynosić szereg korzyści gospodarczych. β-glukany zwiększają odporność organizmu na choroby. Dzięki czemu uzyskuje się poprawę wyników produkcyjnych w tuczu świń. Skuteczne działanie w ograniczaniu biegunek, wywołanych przez *L. intracellularis*, wykazują również dodatki fitogeniczne. Na podstawie przeanalizowanych wyników badań można stwierdzić, że często konieczne i celowe jest zastosowanie dodatków paszowych w żywieniu zwierząt.

Słowa kluczowe: *Lawsonia intracellularis*, dodatki paszowe, wyniki produkcyjne, świnie

Impact assessment of selected feed additives on reducing the occurrence of *Lawsonia intracellularis* in pig herds

Abstract

Given the intensity of pig rearing, new solutions are being sought that could be used to reduce the occurrence of *Lawsonia. intracellularis*. The aim of the study is to review the results of research on the use of feed additives, which will also increase the efficiency of pig rearing by improving animal health.

Lawsonia intracellularis is commonly found in many pig herds (mainly in large farms) and infection is commonly associated with reducing the efficiency of rearing because of reduced weight gain and feed conversion. Economic losses result mainly from the presence of intestinal adenomatosis (PPE) or proliferative hemorrhagic enteropathy (PHE) caused by *L. intracellularis* in pigs. The main symptoms are diarrhea, but in the chronic disease very often the course are atypical signs (reduced weight gain, decreased feed efficiency and increased mortality rates are noted). Bacterial infection reduces the growth rate of animals, which affects production results and may lead to PHE. Occasionally, sudden death is reported.

Control of *L. intracellularis* infection is mainly accomplished by treatment with antibiotics or the administration of a vaccine. Antibiotics may reduce the prevalence of PPE in pigs, but must be used early in the early stages of infection. When antibiotics are given too early, piglets may not develop active immunity against *L. intracellularis*. In addition, the use of antibiotics may increase the resistance of bacterial strains to this substance. Another procedure is vaccination. However, there are voices among practitioners that vaccines are not effective enough, which makes it necessary to study on improving them.

Another way to counteract infection by *L. intracellularis* is to use probiotic (especially lactic acid bacteria) and prebiotic and phytogenic additives in animal nutrition. Lactic acid lowers the pH and uses the „competitive exclusion" mechanism to eliminate *L. intracellularis*. The active substances isolated from yeast, such as β-D-1-3 / 1-6-glucans, are also of particular interest around this subject. These compounds in the feeding of young pigs can bring a number of economic benefits. β-glucans increase resistance to disease. This results in improved production results in pig fattening. Phytogenic additives are also effective in reducing diarrhea cause by *L. intracellularis*. On the basis of the analyzed results of many research, it can be concluded that it is often necessary and useful to use feed additives in animal nutrition.

Keywords: *Lawsonia intracellularis*, feed additives, performance, swine

Magdalena Gajęcka[1], Łukasz Zielonka[2], Maciej T. Gajęcki[3]

Komplementarność badań niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej na wybrane wskaźniki zdrowotne niedojrzałych płciowo loszek

1. Wprowadzenie

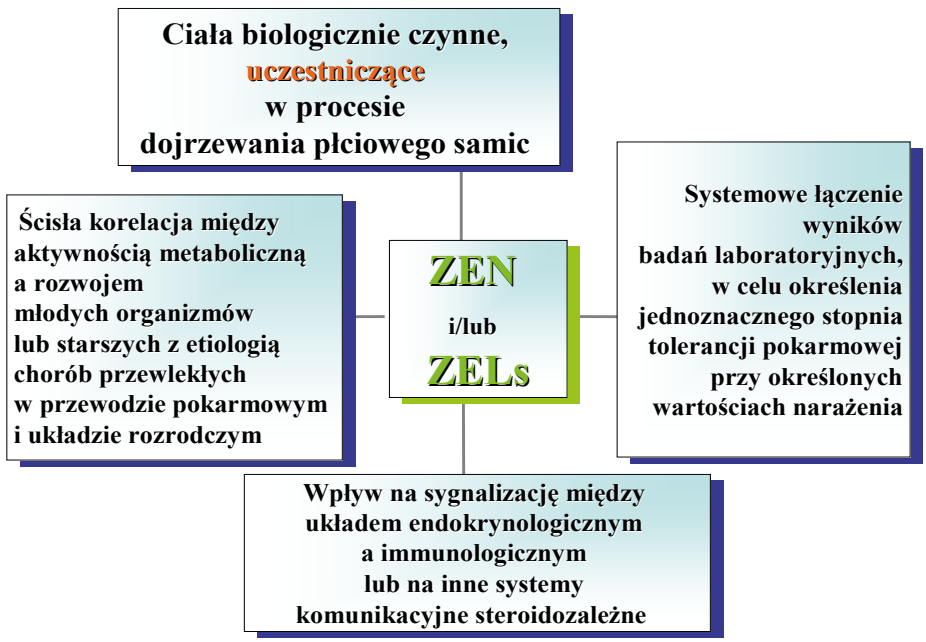
Duży odsetek materiałów roślinnych i produktów pochodzenia roślinnego wykorzystywanych przez producentów pasz [1], jest przyczynkiem do wystąpienia ryzyka zatrucia mikotoksynami (substancjami niepożądanymi) ludzi [2] i różnych gatunków zwierząt gospodarskich, a szczególnie świń [3]. W odniesieniu do wielu mikotoksyn, w tym zearalenonu (ZEN), znane są objawy i konsekwencje zdrowotne (toksykologiczne) wynikające z narażenia organizmu wysokimi dawkami tych związków [4-6]. Zgodnie z paradygmatem hormezy (zjawisko korzystnego wpływu małych dawek czynnika szkodliwego) [7, 8], bardziej istotnym staje się poznanie problemów wynikających z faktu narażania niskimi dawkami, często spotykanymi w materiałach paszowych. Badawczo, bardzo interesującym stało się określenie stopnia dysfunkcji organizmu ssaków narażonych czystą substancją macierzystą [9-11] bez metabolitów czy zmodyfikowanych mikotoksyn [8].

Większość mikotoksyn fuzaryjnych jest wchłaniana głównie w proksymalnej części jelita cienkiego [3, 12]. Spowodowane jest to dużą zmiennością fizjologiczną poszczególnych odcinków jelit. Kolejnym etapem procesu biotransformacji, jest krew i toczące się w niej procesy, które pozwalają na diagnozowanie w sposób mało inwazyjny stanu zdrowotnego zwierząt [13] oraz na poznanie nowych biomarkerów określonych stanów chorobowych [14], gdzie np. ZEN, można byłoby potraktować jako biomarker farmakodynamiczny, dzięki któremu obecnie, można wskazać wyniki interakcji między mikotoksyną a celem [15]. Tym celem najczęściej jest komórka [16], w której zearalenon lub ZEN i jego metabolity mogą wywoływać określone stany, nie tylko poprzez regulację metabolizmu enzymów [9, 17], czy ekspresję genów [11], ale ZEN i jego metabolity działają jako ligand, wiążąc się z określonymi receptorami na poziomie błon lub jąder komórkowych [18], a przez to uczestniczyć w dalszym przekazywania sygnału.

Zgodnie z dotychczasową wiedzą [19] na temat zmian towarzyszących narażeniu małymi dawkami ZEN, należy stwierdzić, że mogą one powodować trudne do przewidzenia reakcje uboczne (rys. 1). Wynika to z wielkości dawki, ale również i z czasu trwania narażenia [14]. Przy małych dawkach, reakcja organizmu bywa zaskakująca, jak np. może mieć miejsce „niedostrzegania obecności substancji niepożądanych typu mikotoksyny" [20], na zasadzie podobnej do teorii limfocytów

[1] mgaja@uwm.edu.pl, Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, St. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn, Polska.
[2] lukasz.zielonka@uwm.ed.pl, Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, St. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn, Polska.
[3] gajecki@uwm.edu.pl, Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, St. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn, Polska.

T-regs [21], polegającej na braku reakcji limfocytów T regulatorowych w sytuacji przedostania się do organizmu małej liczby czynników zakaźnych. W przypadku przedłużającego się narażenia ZEN, podawanego per os, ma miejsce zwiększanie jego absorpcji do organizmu gospodarza [22], czemu towarzyszy efekt kompensacji [23], który polega na wyhamowaniu aktywności badanych wskaźników. Po nim następuje powrót organizmu do stanu wyjściowego [24], mimo trwającego w dalszym ciągu narażenia [9]. Oba wspomniane czynniki, jak i wielokierunkowość aktywności ZEN i jego znanych metabolitów (rys. 1) [19] wraz z formą i stopniem zaangażowania w odpowiedź organizmu loszek, co powinno powodować zwiększenie zainteresowania obecnością niskich dawek ZEN w diecie.



Rysunek 1. Wielokierunkowość aktywności ZEN i ZEL-s

Chcąc określić co to jest niska dawka, na podstawie badań własnych [9-11], wzięto pod uwagę obecność lub brak objawów klinicznych podczas mikotoksykoz zearalenonowych o różnym stopniu narażenia. W związku z powyższym, interpretując wyniki własne i innych wzięliśmy pod uwagę trzy dawki narażenia (rys. 2). I tak:

- najniższa dawka w wartości LOAEL (lowest observed adverse effect level: > 10 μg ZEN/kg mc) [19, 25, 26], powodująca wystąpienie objawów klinicznych [3];
- najwyższa dawka, niewywołująca objawów klinicznych (stany subkliniczne), czyli dawka NOAEL (no observed adverse effect levels: – 10 μg ZEN/kg mc) [27];
- najmniejsza mierzalna dawka, wchodząca w pozytywną interakcję z organizmem gospodarza, w różnych etapach życia, tzw. dawka MABEL (minimal anticipated biological effect level: < 10 μg ZEN/kg mc) – dawka mierzalna [28, 29].

Rysunek 2. Różnorodność dawek spotykanych w środowisku

Z racji, że ZEN jest mikoestrogenem, to obowiązujący paradygmat dawka-odpowiedź został zakwestionowany przez „hipotezę niskiej dawki" [19]. Dotyczy to w szczególności związków chemicznych hormonalnie aktywnych [30]. Ta niejednoznaczna współzależność między dawką a reakcją, nie pozwala na prostą, czyli bezpośrednią, jednoznaczną to znaczy monotoniczną ekstrapolację, czy metaanalizy, oceny ryzyka reakcji (objawów klinicznych czy wyników laboratoryjnych) przez przeniesienie z wysokiej dawki na niską [3, 24]. Z punktu widzenia praktyk biomedycznych coraz bardziej interesujące staje się pojęcie „minimalnej dawki" [13]. Pojęcie, które wprowadza jedną z podstawowych zasad medycyny precyzyjnej [31]. Ta przełomowa koncepcja uwzględnia zarówno indywidualną zmienność, jak i cechy populacji w celu zapewnienia działań holistycznych. Takie podejście poszerza wiedzę biologiczną, ponieważ bada liczne i różnorodne grupy osobników (chów fermowy), na wielu płaszczyznach biologiczno-medycznych. Dokonuje się tego, przez wykorzystanie wyspecjalizowanego sprzętu laboratoryjnego, umożliwiającego pozyskiwanie szerokiego spektrum informacji o określonych biomarkerach: genach, produktach ekspresji genów oraz metabolitach [13, 32]. Z drugiej strony niska dawka, którą należy rozumieć, jako dawkę wywołującą odwrotny efekt [7] zgodnie z paradygmatem hormezy, do którego nie jesteśmy obecnie przygotowani. Z racji tej, zrozumienie sposobu działania małych dawek, powinno być wymogiem podczas podejmowania decyzji, dla ilościowej i jakościowej oceny ryzyka [33, 34].

Celem przedstawionej pracy, było przeanalizowanie dotychczasowych rozwiązań hipotez medycznych, dotyczących niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej, wykorzystujących wielokierunkowe i precyzyjne metody badań diagnostycznych, na wielu poziomach informacji biologicznej, z myślą przedstawienia w sposób komplementarny wybranych tematów weterynaryjnej medycyny precyzyjnej [13] u niedojrzałych płciowo loszek.

2. Zearalenon i jego metabolity

Niewielkie dawki ZEN są często spotykane w roślinnym materiale paszowym. Efektem jest niskodawkowa mikotoksykoza zearalenonowa. Z badań Zeng i wsp. [35] wynika, że w organizmie świń, dzięki zwiększonej aktywności 3α-HSD, w porównaniu do innych zwierząt gospodarskich, podczas biotransformacji ZEN powstaje więcej α-ZEL niż β-ZEL, ale przy wyższych dawkach narażenia. Stwierdzono, że podczas niskodawkowego narażenia ma miejsce sytuacja odwrotna [36]. Z racji tej, określone wartości stężeń ZEN i jego metabolitów we krwi obwodowej, należy postrzegać jako efekt toczących się procesów biotransformacji w organizmie niedojrzałych płciowo loszek, które nie wywołują hiperestrogenizmu, ale uzupełniają fizjologiczne niedobory endogennych estrogenów u tych zwierząt [37]. Potwierdzającym przykładem są wartości substancji macierzystej i jej metabolitów u loszek, które narażano ZEN w wartościach MABEL [36]. W pierwszym tygodniu narażenia nie stwierdzano obecności metabolitów ZEN, z racji niskiej podaży endogennych hormonów sterydowych. W kolejnych terminach w surowicy krwi wykazano, że oprócz substancji macierzystej, to β-ZEL był metabolitem dominującym [19, 38]. Można jedynie dywagować, że np. były to wartości fizjologiczne niezbędne do funkcjonowania organizmu [39] lub, że zaistniała sytuacja mogła być wynikiem „zwiększonego popytu" organizmu gospodarza, na związki o wysokiej aktywności estrogenowej, jakimi legitymują się α-ZEL i ZEN [38, 40]. Można to również tłumaczyć tym, że:

- siódmy dzień narażenia substancją niepożądaną, jaką jest ZEN, jest terminem końcowym dla procesów adaptacyjnych, a zwłaszcza odporności adaptacyjnej [41];
- ZEN został wykorzystany jako substrat regulujący (odwrotnie proporcjonalnie) poziom ekspresji genów kodujących HSDs, które są swego rodzaju przełącznikiem molekularnym dopuszczającym do modulacji prereceptorów hormonów sterydowych [17, 42, 43];
- miała miejsce wzmożona recyrkulacja wątrobowo-jelitowa przed całkowitym wydaleniem tych substancji [19, 44];
- została zaburzona homeostaza mikrobioty jelitowej w części dystalnej, podczas narażenia ZEN [10].

Przedstawione sugestie, wszystkie razem lub każda z osobna, mogą tłumaczyć poziom ZEN i jego metabolitów we krwi obwodowej z racji wielokierunkowej aktywności omawianej mikotoksyny [19]. Jedną z nich jest hamowanie syntezy i wydzielanie FSH (*follicle-stimulating hormone* [35]) w wyniku ujemnego sprzężenia zwrotnego, które w konsekwencji powoduje spadek produkcji sterydów [45, 46].

Podczas przedłużającego się narażenia niskimi dawkami ZEN, również występują podobne współzależności w wartościach średnich stężeń ZEN i jego metabolitów we krwi obwodowej [36]. Konsekwencją przedłużającego się narażenia ZEN, powyżej siedmiu dni, są: po pierwsze, obecność obu badanych metabolitów ZEN. Po drugie, stwierdzenie wyższych wartości wszystkich badanych wskaźników (ZEN + metabolity), prawdopodobnie jako wynik kumulacji, z racji wysycenia aktywnych receptorów estrogenowych i/lub innych czynników decydujących o wartości stężeń hormonów sterydowych [45-47], w miarę upływu czasu narażenia. Wyniki badań innych autorów, dotyczące efektów biotransformacji ZEN we krwi obwodowej, były efektem narażenia zwierząt dużo wyższymi dawkami ZEN [19, 48, 49].

Z racji tej można byłoby sugerować, że narażenie bardzo niskimi dawkami ZEN, zgodnie z paradygmatem hormezy [7, 19, 50], wpływa na syntezę i wydzielanie steroidowych hormonów płciowych [19, 38, 51]. To znaczy, że procesy biotransformacji bardzo niskich dawek ZEN nie przebiegają identycznie, ale wykorzystanie substancji macierzystej (ZEN) i powstałych metabolitów przez makroorganizm, jest większy lub całkowity przy dawce MABEL. Bardzo możliwe, że na procesy interakcji sterydów endogennych ze środowiskowymi (egzogennymi) mają wpływ i inne endogenne czynniki [52], jak np.: zmieniająca się kondycja organizmu, przebieg procesów detoksykacji czy zmieniający się poziom reaktywnych form tlenu.

3. Profil metaboliczny

Bardzo skromna jest liczba opracowań naukowych na temat ewentualnej zmienności wyników profilu metabolicznego zwierząt narażonych niskimi dawkami ZEN (MABEL, NOAEL i najniższe dawki LOAEL), co jest niezmiernie ważne, podczas próby interpretacji [9, 53] tych wartości. Dostępne prace [54, 55] nie bardzo przystają jednak do omawianych wyników narażenia. Spowodowane to jest: odmienną masą ciała świń uczestniczących w doświadczeniu, wielkością podawanej dawki, czasem narażenia ZEN lub innymi czynnikami. U zwierząt narażanych procesy przemiany materii przebiegają w formie bardziej stonowanej [9]. Wskaźniki biochemiczne surowicy krwi, pozyskiwane podczas niskodawkowej mikotoksykozy, w miarę upływu czasu narażenia mają tendencję spadkową. Może to być efekt kompensacji, który polega na pobudzeniu lub wyhamowaniu aktywności określonych wskaźników, po początkowym okresie narażenia [9, 23, 24, 53]. Wynika to również z potrzeby czasu, do dodatkowego zaangażowania energetycznego organizmu loszek w procesy biotransformacji ZEN [9, 24, 49, 53], czemu towarzyszy sukcesywny spadek stężenia glukozy. Równolegle mają miejsce zwiększone przyrosty masy ciała, co pobudza zapotrzebowanie na białko w paszy [56]. Wyrazem tych zmian, jest obniżony poziom białka całkowitego oraz glukozy w surowicy krwi.

Kolejnym wskaźnikiem mogą być aminotransferazy, od dawna wykorzystywane, jako wskaźnik chorób wątroby u ludzi i zwierząt. Uznawane są za swego rodzaju, „liverspecific" [57]. Są one uwalniane do krwi proporcjonalnie do liczby uszkodzonych komórek i wykorzystywane jako markery stanów zapalnych [19]. Z badań niektórych autorów [9, 49, 53] wynika, że u loszek narażonych wyższymi dawkami ZEN aktywność enzymów nekrotycznych utrzymuje się na podobnych poziomach. Aktywność enzymatyczna aminotransferazy alaninowej (ALT) podczas narażenia niskimi dawkami ma tendencję spadkową, w miarę trwania narażenia. Jest to zbieżne, z wynikami badań dotyczących innych czynników stymulujących [57]. Może to być np. „sygnał" o mającym miejsce spowolnieniu czynnościowym wątroby [58, 59]. W przypadku aminotransferazy asparaginianowej (AST) aktywność ma tendencję wzrostową. Wynika to prawdopodobnie ze stopniowego przystosowywania się zwierząt do małych wartości narażenia (procesu tolerancji pokarmowej [60] a może kompensacji [23]). W związku z tym nasuwa się wniosek, że stężenie ZEN, jest rozstrzygane na poziomie nabłonka jelitowego [61-64], chociaż nie zawsze [46], np. w pierwszym okresie narażenia. Zaistniała sytuacja dowodzi w sposób pośredni, że:

• postępujące mieszane tendencje wzrostowo/spadkowe aktywności obu nekrotycznych enzymów, są wynikiem toczącego się procesu, łagodzenia stanu

zapalnego w wątrobie [59];

- czemu towarzyszy rekonwalescencja funkcji wątroby [65].

Przedstawione sugestie, z reguły znajdują potwierdzenie we wskaźniku de Ritis (stosunek AST/ALT) [53, 66, 67]. Współczynnik ten zwykle oscyluje koło wartości 1, z nieznaczną tendencją wzrostową w miarę trwania procesu narażenia. Przebieg procesu jest wprost proporcjonalny do dawki narażenia ZEN. Dokumentuje on stopień zaangażowania innych tkanek (wprost proporcjonalnie), w rozwój organizmu, jak np. mięśnia sercowego [67], mięśnie szkieletowe, a nawet erytrocytów, czemu może towarzyszyć dysfunkcja wątroby [66].

Zgodnie z sugestiami Li i Patience [56] u młodych zwierząt są dwa wyznaczniki średniego dziennego pobrania paszy. Pierwszym jest gęstość energii, a drugim oznacza się fizyczną zdolność pobierania paszy niezależnie od stężenia energii w diecie. W obu przypadkach nośnikiem energii jest glukoza. Wysokie stężenia glukozy (> 5,5 mmol/L) u świń są bardzo rzadkie. Stany hipoglikemii i tolerancji pokarmowej poprzedzonych allostazą potwierdzają wpływ mikoestrogenu, jakim jest ZEN, na homeostazę glukozy [49, 53, 68]. Z kolei efekt anaboliczny powoduje spadek poziomu glukozy jako wynik [69], natywnej (standardowej) konwersji chemicznej mikotoksyn [8] (przy niskich dawkach) do pochodnych glikozylowych, czemu towarzyszy peroksydacja lipidów. Pochodnych powstających w wyniku interakcji z jednostkami glukozy, uwalnianej w jelicie cienkim (szczególnie w końcowym odcinku dwunastnicy i na poziomie jelita czczego, czyli w proksymalnej części jelita cienkiego) z materiałów paszowych [70]. Zwiększona peroksydacja lipidów upośledza z kolei funkcje błon komórkowych, przez zmniejszenie płynności tych błon, co powoduje zmianę aktywności enzymów i receptorów związanych z błonami [71]. Z kolei, zwiększenie liczby nadtlenków lipidowych może być również wynikiem zwiększonej glikacji białek, które mogą być wolnymi rodnikami. W dwunastnicy ma miejsce najszybsza i największa przyswajalność ZEN – w granicach 80-90% pobranej dawki, co wymaga dużo energii [24, 46, 72]. Trwające procesy biotransformacji, czy tylko detoksykacji, na poziomie enterocytu lub w wątrobie oraz utrzymanie przyrostów masy ciała, może tłumaczyć spadek glukozy we krwi peryferyjnej, niedojrzałych płciowo loszek, co przyśpiesza przeniesienie i wysycenie ścian jelita cienkiego, które przy tych wyższych dawkach trwa dużo krócej.

Stężenie białka całkowitego we krwi zależy od wielu czynników [56], jak np.:

- od ilości i jakości pobranej paszy;
- od ilości obecnego w paszy białka roślinnego i zwierzęcego;
- od stopnia wykorzystania pozyskiwanego białka, czyli aktywności wyspecjalizowanych tkanek (przyrosty);
- od stopnia utraty białka przez układ pokarmowy, moczowy, płuca i skórę.

Zearalenon, jak i jego katecholowe metabolity są przyczynkiem do stymulacji bezpośredniej procesów przemiany materii. Samym działaniem przypomina stymulator wzrostu [73] z racji swych właściwości estrogeno-podobnych [19, 74], ale nie w wyniku kumulacji [7]. Efektem tego, jest:

- ustabilizowane zwiększanie przyrostów masy ciała;
- zwiększenie wykorzystania białka paszowego, co prowokuje wzrost wskaźnika de Ritisa, sugerując zwiększone zaangażowanie loszek w przyrosty masy ciała [67];

• ale również tendencja spadkowa stężenia białka całkowitego w surowicy krwi szczególnie w długo trwających narażeniach [38].

Innym efektem, który należałoby brać pod uwagę podczas narażania organizmów loszek niskimi dawkami mikotoksyn typu ZEN [38] jest efekt kompensacji [23], poprzedzony obciążeniem allostatycznym. Z badań własnych [9] wynika, że ma miejsce nieznaczna hipoproteinemia, której towarzyszy nieznaczna tendencja wzrostowa badanego wskaźnika. Towarzyszy temu jednak duża zmienność tego wskaźnika w różnych terminach narażenia. Są jednak kompatybilne w znacznym stopniu z wartościami glukozy, czy wskaźnikiem De Ritisa.

Niskie wartości ZEN, spełniają również rolę inhibitora absorpcji cholesterolu w jelitach [9, 68]. Przedstawiona sytuacja może sugerować o:

• pośredniej kontroli, nad uruchamianiem procesu sterydogenezy [75];

• niskocholesterolowej diecie [76];

• zdolności anaboliczno-lipogenicznej z racji obecności komórek trzustki typu beta o dużej pojemności [77];

• aktywności adaptogennej niskich wartości ZEN wraz ze stymulacją wzrostu [68, 78].

Bardzo niskie wartości ZEN prawdopodobnie są czynnikiem obniżającym wartości bilirubiny całkowitej we krwi. Z racji, że bilirubina powstaje podczas rozpadu hemu, przedostaje się do osocza, a następnie z krwią wędruje do wątroby, gdzie podlega serii przemian. Można przypuszczać, że trwający fizjologiczny rozpad krwinek, ulega szybko ponownemu wykorzystaniu przez organizm loszek i stąd tak niskie wartości [9,79], co potwierdza brak toczących się procesów chorobowych w wątrobie.

Z kolei, fosfataza alkaliczna (ALP) odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu stosunku fosforanu do nieorganicznego pirofosforanu i tym samym reguluje zwapnienie macierzy pozakomórkowej podczas tworzenia i wzrostu kości [80]. Niskie dawki ZEN zmniejszają stopień aktywności swoistej ALP w tkankach [9], przez co zmniejszają kumulację wewnątrzkomórkową wapnia i lipidów [80, 81], co sprzyja wykorzystaniu ich do celów energetycznych.

W większości opublikowanych wyników badań surowicy krwi [9, 49, 53] ma miejsce spadek wartości żelaza. Jest on spowodowany spowolnieniem jego transportu z enterocytów do układu krążenia za pośrednictwem ferroportyny, która jest ściśle regulowana przez hepcydynę. Jako hormon regulacyjny, produkowany przez hepatocyty w odpowiedzi na zmienne poziomy żelaza, ale także w odpowiedzi na wzrost poziomu prozapalnej cytokiny IL-6 we krwi [82]. Jest to wynik stanu zapalnego [38] ściany przewodu pokarmowego, w którym stwierdzano histologicznie zmiany, wskazujące na toczący się miejscowo stan zapalny dwunastnicy i jelita czczego [62, 63]. Stwierdzano w nich, w zrębie kosmków i w przestrzeni między kryptami, obecność tkanki łącznej z naczyniami krwionośnymi i komórkami układu odpornościowego – limfocytami, plazmocytami i granulocytami kwasochłonnymi.

4. Morfologia krwi obwodowej

Zmiany w obrazie białokrwinkowym mogą mieć miejsce w wyniku obecności w paszy substancji niepożądanych typu ZEN [83]. Z zasady stwierdzano obniżenie wartości wskaźników białokrwinkowych, co wskazywałoby na brak pobudzenia układu odpornościowego. Z kolei Etim i wsp. [84] stawiają hipotezę, że ogólny

układ immunologiczny jest bardziej stymulowany czynnikami odżywczymi i stresem dietetycznym niż stresem funkcjonalnym. W zaistniałej sytuacji należałoby również wziąć pod uwagę wartości eozynocytów, których procent wzrasta podczas mikotoksykozy zearalenonowej. W związku z tym, ZEN może wywierać działanie alergizujące [19, 53, 85].

Z drugiej strony stwierdzano nieznaczny wzrost w udziale procentowym limfocytów, jako tzw. względną limfocytozę [9, 86], której towarzyszył spadek udziału neutrocytów. Z doniesień Wang i wsp. [74] wynika, że pod wpływem ZEN i reaktywnych form tlenu (ROS – *reactive oxygen species*), może powstawać NET, czyli zewnątrzkomórkowa pułapka neutrofili, która między innymi bierze udział w patofizjologii procesów „autozapalnych". Jak również, podczas narażenia ZEN, ma miejsce migracja limfocytów do tkanek, o fizjologicznie zwiększonym udziale receptorów estrogenowych. W efekcie, ma miejsce wzmożenie procesów proliferacyjnych, z równoczesnym silniejszym wypełnieniem naczyń krwionośnych [20, 62, 87]. Przeciwstawne wyniki opublikowali Ren i wsp. [88], gdzie udokumentowali apoptotyczne właściwości ZEN wobec limfocytów, ale w hodowli *in vitro*, gdzie komórki były traktowane bardzo wysokimi stężeniami ZEN. W kilku pracach udokumentowano fakt, spadku liczby limfocytów podczas narażenia ZEN. Dowodzi to, o wpływie ZEN na mechanizmy adaptacyjne, w postaci odwracalnych zmian morfo-funkcjonalnych miejscowego układu immunologicznego [20, 62, 86]. Jako wynik, dwufazowej hormonalnej odpowiedzi na dawkę [7].

Erytrocyty są głównym składnikiem morfotycznym krwi, szczególnie podatnym na endogenne czynniki np. oksydacyjne. Wyposażone są one w wydajne systemy antyoksydacyjne, kluczowe w procesie odtruwania komórki z ROS, które są wytwarzane w nadmiarze na zewnątrz lub wewnątrz erytrocytów [89]. Jak wynika z badań Tatay i wsp. [90], ZEN ma silną aktywność antyoksydacyjną [78] i jednym z działań ubocznych mikoestrogenu, jest spadek liczby erytrocytów. Prawdopodobnie ma to miejsce, w wyniku „konkurencyjności antyoksydacyjnej" [78]. Potwierdzają to również, wyniki badań Jilani i Lang [91], w których udokumentowano wyniki ekspozycji ZEN na dojrzałe erytrocyty ludzkie, czego wynikiem była eryptoza. Jak twierdzą ci sami autorzy, eryptoza może mieć miejsce nawet przy niskich stężeniach ZEN. Może być ona również stymulowana w wyniku mechanistycznego wzrostu wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} [92-94] stresem oksydacyjnym, spadkiem zasobów energetycznych [95], czy w wyniku narażenia substancjami niepożądanymi jak np. ZEN [9, 92]. Jednym z kontrargumentów jest fakt, że ubytek zewnętrzkomókowego Ca^{2+} może równocześnie tłumić efekt eryptotyczny [96]. Przedstawione sytuacje, są związane z patogenezą niedokrwistości czy zaburzeniami mikrokrążeniowymi. Te ostatnie mają miejsce w różnych tkankach, podczas narażeń ZEN i wyrażają się w formie licznych wynaczynień i obecności naczyń z rozszerzonym światłem [18, 87] u dojrzewających żeńskich organizmów ssaków.

Najważniejsze wskaźniki płytkowe, które ocenia się podczas badań morfologicznych krwi to: płytki krwi (PLT), średnia objętość płytki krwi (MPV) (jako wyznacznik funkcji płytek [97]) czy odsetek dużych płytek (PLT Large). Z reguły podczas narażenia ZEN, wartości PLT i PLT Large są podwyższone [9], z racji uczestnictwa we wczesnych fazach regeneracji wątroby [98]. Mechanizmy nie są jednak znane.

Wątroba, jest jednak głównym organem odpowiedzialnym za procesy biotransformacji. Bardzo często, towarzyszy temu fałszywie obniżony udział procentowy PLT Clumps (pseudotrombocytopenia). Tego rodzaju sytuacje mogą być wynikiem niespełniania wymogów laboratoryjnych, przez co zwiększa się liczba artefaktów krwi [99]. Towarzyszy temu duża zmienność w wartościach MPV. Tego rodzaju zmienność „wyznacznika funkcji płytek" może być wynikiem:

- wzmożenia procesów proliferacyjnych;
- oraz sytuacją charakterystyczną dla młodych organizmów dojrzewających [9] będących w trakcie przyjmowania substancji stymulujących [100].

5. Hormony sterydowe

Na obraz kliniczny, wpływa ilość i jakość substancji egzogennych, o właściwościach hormono-podobnych [45] oraz kontrreakcja makroorganizmu, która nie jest znana [101]. Przykładem tego może być zearalenon powodujący zaburzenia homeostazy hormonalnej, który kwestionuje tradycyjne pojęcia w toksykologii, a szczególnie dogmat, że „dawka czyni truciznę" [19, 102]. ZEN i jego metabolity (ZELs), wywołują określone odmienne zmiany homeostatyczne, podczas narażenia niskimi dawkami [9-11].

W wielu badaniach z hormonami naturalnymi i EDs (*endocrine disruptors* – substancje zaburzające gospodarkę hormonalną) dowiedziono, że niskie dawki dają niejednoznaczną odpowiedź (np. pro- lub przeciwzapalną [103]) oraz pobudzenie lub wyhamowanie aktywności proliferacyjnej [104]. Przykładem tego jest również ZEN i jego metabolity [35, 62, 105]. Selektywne niskie dawki ZEN, oceniane przez Rykaczewską i wsp. [36], w każdym z przedziałów swych wartości, potwierdzały słuszność założeń, co do istoty wpływu tychże dawek, w różnych terminach narażenia, na poziomy estradiolu (E2), progesteronu (P4) i testosteronu (T) w surowicy krwi loszek. Szczególnie jest to istotne, podczas dłuższego narażenia ZEN. Prawdopodobnie ma miejsce hiperestrogenizm wywołany nadmiarem ZEN (związku, który nie uległ procesom biotransformacji lub został odzyskany po recyrkulacji wątrobowo-jelitowej). Ten tzw. wolny ZEN, może być wykorzystywany do określonych celów [19]. Jednym z takich „celów", jest bycie konkurencją dla endogennego E2 lub współdecydowaniu o jego podaży. Przykładem jest fakt, że nawet dawki MABEL, NOAEL i bardzo niskie LOAEL, powodują istotny wzrost wartości stężeń wywołujących stany hiperestrogenizmu czy ponadfizjologiczne poziomy hormonalne (*supraphysiological hormonal levels*) [36, 37]. Jest to swoisty efekt kontrreakcji organizmu loszek na obecność określonych dawek ZEN. W związku z tym „wolny ZEN" jest przechwytywany przez receptory estrogenowe (ERs) w określonych tkankach (47), przez co staje się czynnikiem bodźcowym do zmian aktywności ERs-ów. Zmiany te następują poprzez przesunięcie w wielkości stopnia ekspresji ERs-ów, a szczególnie ERß, w okrężnicy, czemu towarzyszy wzrost ilościowy mikrobioty jelitowej oraz wzrost genotoksyczności ZEN w dawkach NOAEL i niskich dawkach LOAEL [10, 11]. Jest to przykład oceny wielopłaszczyznowej efektów aktywności ZEN i jego metabolitów, jako biomarkerów mikotoksykozy.

Z wartości stężeń E2 we krwi obwodowej [36], jak i profilu metabolicznego loszek [9] wynika, że „wolny ZEN" jest przyczyną:

- zmiany przebiegu sterydogenezy (co potwierdzałoby, że ZEN zmienia ekspresję

enzymów typu HSD na poziom pre-receptorowym odwrotnie proporcjonalnie do wielkości narażenia [17, 43]), czy konwersji T w E2;

- wzmożenia żerności loszek i odkładania się substancji energetycznych [9], regulowanej homeostatycznie, by wspomóc późniejszą prokreację organizmu [106].
- Towarzyszy temu supresyjny wpływ ZEN na poziomy stężeń P4 i T [107]. Jest to bardzo istotne w przypadku chorób autoimmunologicznych [41], ale co ważniejsze, w procesie technologicznym produkcji wieprzowiny (przyczynia się do hamowania procesów dojrzewania loszek [108, 109]).

Analizując stężenia P4 we krwi niedojrzałych płciowo loszek [37], narażonych różnymi dawkami ZEN, stwierdzano tendencję wzrostową w miarę trwania doświadczenia. Tak więc, przedwczesny wzrost poziomu P4, mógłby podwyższać receptywność endometrium (co jest niekorzystne), w wyniku obecnych zmian morfometrycznych w układzie rozrodczym [108]. Przedstawione sugestie i spostrzeżenia dowodzą, że obecność ZEN w paszy w wartościach MABEL i NOAEL jest czynnikiem powodującym wystąpienie ponadfizjologicznych poziomów hormonalnych [37], a przez to deprecjonującym syntezę P4, ale w organizmie niedojrzałych płciowo loszek, przed pierwszą rują. To znaczy, że przy dwóch najniższych wartościach narażenia (MABEL i NOAEL), ma miejsce hamujący wpływ P4 na wytwarzanie przeciwciał, zwłaszcza tych, które są asymetrycznie glikozylowane, a zatem niezdolnych do wyzwalania immunologicznych mechanizmów efektorowych [41]. Zaistniała sytuacja może wynikać z faktu, że zarówno hormony endogenne, jak i ZEN jako EDs [30], wykazują aktywność hormonalną, poprzez przyłączania się do jądrowych receptorów hormonalnych (swego rodzaju rywalizacja). W efekcie mogą wywoływać nieoczekiwane skutki [92], jak np.: podwyższenie udziału Ca^{2+} w mitochondriach, czy destrukcję mitochondriów.

Trzecim, bardzo interesującym hormonem sterydowym, jest testosteron (T) [36]. Endogenny T, odgrywa kluczową rolę w zdrowiu samic, poprzez: bezpośrednie działanie androgenne lub w wyniku konwersji w E2 [110]. Jest to hormon, który ma znany rytm dobowy [111]. Jego stężenie we krwi samic, zależy od fazy cyklu płciowego oraz od siły i czasu trwania czynnika stresującego [112]. Testosteron jest ważnym regulatorem:

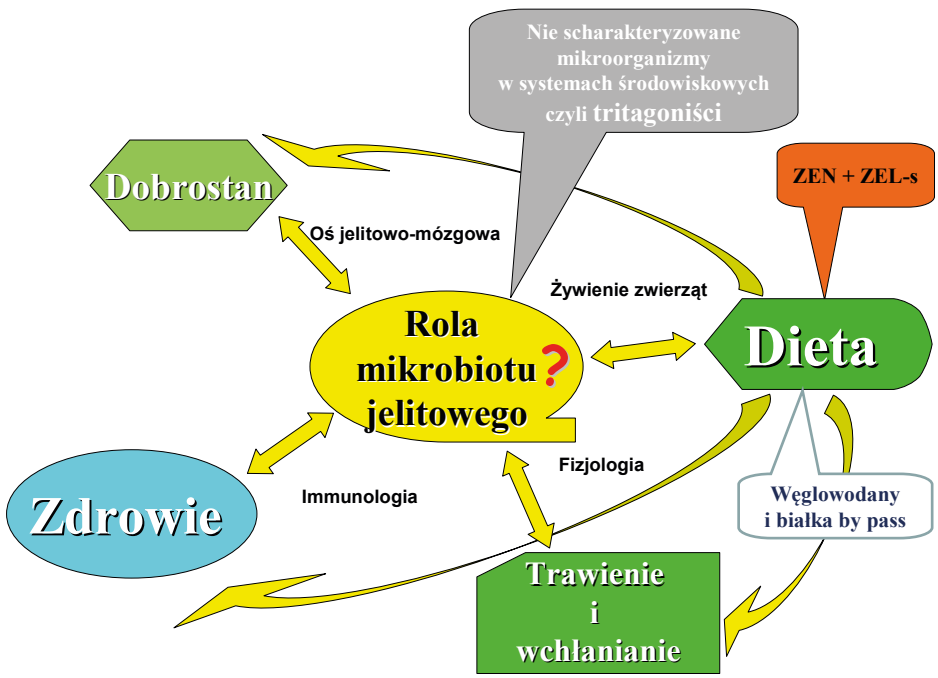
- zróżnicowania płciowego;
- masy mięśniowej i kostnej;
- procesów erytropoetycznych i metabolicznych.

Testosteron może wywierać swoje działanie biologiczne bezpośrednio lub pośrednio np. poprzez konwersję w E2 [113]. Porównując wartości stężeń T we krwi niedojrzałych płciowo loszek [36], z wielkościami przyrostów masy ciała tych zwierząt [9], zauważono korelację wprost proporcjonalną. Wynika również, że zapotrzebowanie fizjologiczne młodego organizmu loszki, które jest dużo większe niż możliwości endogennego T, ratuje „wolny ZEN", np. poprzez zmianę ekspresji enzymów typu HSD [17]. Rodzi się natomiast inne pytanie – dlaczego w trzecim tygodniu narażenia ZEN, ma miejsce, stałe wysokie stężenie T u badanych niedojrzałych płciowo loszek? Jest to pytanie na które brak jest odpowiedzi. Z sugestii van Anders i wsp. [114] wynika, że również walki hierarchiczne (konkurencja) i przykłady behawioralne, takie jak podtrzymywanie władzy i określonego statusu w stadzie, zależą od poziomu T,

bez względu na płeć. Nie potwierdzają tego Kanakis i wsp. [111] oraz White i wsp. [112], w odniesieniu do organizmów dojrzewających (niedojrzałych płciowo loszek), że wartości stężeń E2 zależą od stopnia wzmożenia konwersji T w E2.

6. Zmienność mikrobioty jelitowej

Mikrobiota jelitowa w sposób bardzo istotny wpływa na zdrowie gospodarza. Najczęściej poprzez procesy trawienne, anomalie odpornościowe, antagonizmy biologiczne i procesy dojrzewania. Czynniki wewnątrz- lub zewnątrzpochodne, czy sam organizm mogą powodować zmiany ilościowe lub jakościowe mikrobitu jelitowego, co może prowadzić do określonych stanów chorobowych [115] (rys. 3).



Rysunek 3. Wielokierunkowość aktywności mikrobioty jelitowej

Bardzo mała liczba prac przedstawia problemy mikrobioty jelitowej podczas narażenia niskimi dawkami ZEN [4, 10, 14, 116]. Zearalenon, swą aktywność może demonstrować już na poziomie opuszki dwunastnicy, która jest proksymalną częścią narządu, a kończy się przed brodawką dwunastnicy większą. W opuszce dwunastnicy panują warunki podobne jak w żołądku, co ma miejsce z racji szczególnego dopływu krwi [117]. Treść pokarmowa ma tendencję do stagnacji w tym regionie, z racji niedorozwoju układu mięśniowego u tak młodych loszek. Wyrazem wpływów żołądkowych jest stan mikrobioty, który jest ubogi. Dotyczy to mikrobotów typu *Escherichia coli* czy *Enterococcus faecalis*. Są to bakterie wszędobylskie, a ich powszechność występowania w przewodzie pokarmowym jest ogólnie znana, choćby z faktu tzw. odpowiedzialności za utrzymanie równowagi jelitowej [118], z wyjątkiem

niektórych patogennych szczepów [119]. Obraz zmienności w przypadku *E. coli* i *E. faecalis* dokumentuje, że przebieg mikotoksykozy przy różnych dawkach narażenia ZEN jest bardzo niski.

Z kolei, trzecia część dwunastnicy, jest najkrótszym odcinkiem jelita cienkiego. Tam, następuje kontakt paszy nasączonej wydzieliną żołądkową, z żółcią i enzymami trawiennymi. Z racji tej, odcinek ten jest determinantem różnorodności mikrobioty w dalszych częściach przewodu pokarmowego [117]. Z tego powodu, dieta (a w tym obecność substancji niepożądanej, jaką jest ZEN [1]) determinuje różnorodność funkcjonalną mikrobiomu w trzeciej części dwunastnicy [10]. Z bardzo skromnej liczby dostępnych publikacji wynika, że ma miejsce ogólny, spadek liczby log CFU/g [116], podczas narażania ZEN w dawkach NOAEL, jak i przy niskiej dawce LOAEL [10]. Przedstawiona sytuacja, do złudzenia przypomina konsekwencje stosowania antybiotyków jako stymulatorów wzrostu u świń [120]. Te subterapeutyczne dawki antybiotyków dawały podobne zmiany w ekosystemie jelit [121], jak podawanie ZEN w dawkach NOAEL. Z kolei dawka MABEL powoduje ilościowy wzrost liczby kolonii bakterii saprofitycznych [10] przez co, mogą konkurencyjnie hamować adhezję do nabłonka jelit mikrobiotów patogennych. W związku z tym rodzi się pytanie, czy niska dawka ZEN może być czynnikiem eubiotycznym [122]? Chyba tak, ponieważ po trzytygodniowym narażeniu dawką MABEL, we krwi stwierdzano głównie obecność β-zearalenolu [36], a więc metabolitu, o mniejszej aktywności metabolicznej i braku aktywności toksycznej u świń [19].

Niskie dawki narażenia w jelicie czczym powodują sytuację podobną, szczególnie w przypadku E. coli. Wynika z tego, że długotrwałe narażenie, nawet niskimi dawkami LOAEL lub NOAEL, powoduje dość istotne zmiany, typu brak lub spadek liczby kolonii, co potwierdza Piotrowska i wsp. [4], podczas narażenia ZEN w stężeniu 40 μg/kg mc. Jedynie dawka MABEL, nie powodowała zmian ilościowych. To znaczyłoby, że ZEN w wyższych dawkach przypuszczalnie jest, substancją bakteriostatyczną lub bakteriobójczą [122], a w najniższej jest substancją stymulującą [19]. U niedojrzałych płciowo loszek z hipoestrogenizmem, ZEN prawdopodobnie jest wykorzystywany w procesie sterydogenezy. Początkowo nie, ale w miarę trwania narażenia (np. w wyniku wysycenia receptorów estrogenowych) ulega biotransformacji, w przeważającej części do β-ZEL [36]. Powstający β-ZEL [1, 8, 38, 123], nie wykazuje aktywności toksycznej, ma mniejszą aktywność metaboliczną [9] i silnie modyfikuje integralność jelitową, odwrotnie-proporcjonalnie do czasu trwania narażenia [38]. Można jedynie dywagować, że to początkowe wzmożenie integralności jelit (do szóstego dnia narażenia), z późniejszym stopniowym słabnięciem pod wpływem ZEN, może wspomagać procesy przenikania bakterii przez ściany jelit z negatywnym skutkiem końcowym. Równocześnie towarzyszy temu wzrost liczby kolonii bakterii saprofitycznych.

W pozostałych dwóch odcinkach, czyli w kątnicy i w okrężnicy zstępującej, liczba kolonii mikrobioty typu *E. coli* czy *E. faecalis* są zdecydowanie wyższa [10, 14]. Wynika z tego, że ZEN wpływa pośrednio wobec tych dwóch mikrobiotów jelitowych Zgodnie z argumentacją Youssef i Kamphues [124], ma miejsce wzrost procesów fermentacyjnych, co wzmaga kwasowość treści okrężnicy. Kątnica jest miejscem, gdzie u młodych loszek kumulują się czynniki dysfunkcji jelit [121].

Jednym z nich jest skrobia odpornościowa (RS – *resistant starch*). Jest to rodzaj skrobi opornej na trawienie enzymatyczne w proksymalnych odcinkach przewodu pokarmowego. Przenoszona do dystalnych odcinków jelit, może być fermentowana przez rezydujące mikrobioty[118]. Mikrobiologiczna fermentacja RS (m.in.: przez *Enterobacterium* spp. i inne) prowadzi do produkcji krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych (SCFA – *short chain fatty acids*). Krótkołańcuchowe kwasy tłuszczowe powodują wzrost i proliferację komórek jelita ślepego, zwiększenie ekspresji genów zaangażowanych w rozwój jelit i tworzenie kwaśnego środowiska. Kwaśne pH hamuje wzrost patogenów, jednocześnie selektywnie promując wzrost pożytecznych mikroorganizmów. Tak więc, RS poprawia efekty zdrowotne i funkcjonowanie jelit poprzez modyfikację oraz stabilizację populacji drobnoustrojów jelitowych a także poprawę stanu immunologicznego gospodarza [125]. Z kolei, towarzysząca zaistniałej sytuacji mikotoksykoza zearalenonowa stymuluje procesy produkcji SCFA [120]. Przedstawione sugestie mają swój wyraz w wartościach logarytmicznych, gdzie nie stwierdza się obecności bakterii z rodzajów *Citrobacter*, *Salmonella*, *Klebsiella* i *Yersinia* lub niektórych gronkowców koagulazo-ujemnych *Coagulase-negative staphylococci* (CNS) [10]. Z kolei, *E. coli* czy *E. faecalis*, nie reagują na zaistniałą sytuację, ponieważ obie te bakterie mają mniejsze znaczenie fizjologiczne w procesie fermentacji [126]. Brak *Coagulase-negative staphylococci*, może być wynikiem toczących się równolegle procesów fermentacyjnych w kątnicy [118] i trwającej mikotoksykozy, co również potwierdzają wyniki analiz różnic między terminami badań innych drobnoustrojów. Powstaje swego rodzaju obrót zamknięty polegający na spadku liczby mikroorganizmów spowodowany obecnością ZEN, w wyniku czego ma miejsce obniżenie liczby SPCA, co z kolei przyczynia się do zachwiania procesów eubiozy w kątnicy [11, 124]. W badaniach laboratoryjnych często się zdarza, brak obecności tego rodzaju patogenów [127, 128]. W przypadku beztlenowych laseczek *Clostridium difficile* trwająca mikotoksykoza zearalenonowa jest stanem sprzyjającym (stymulującym) do rozwoju tej bakterii, proporcjonalnie do dawki ZEN. Z racji zmian dysbiotycznych, w wyniku narażenia ZEN w kątnicy, a szczególnie mikrobioty oportunistycznej typu *C. difficile*, można postawić hipotezę, że ZEN w niskich dawkach LOAEL i NOAEL sprzyja wystąpieniu zmian patologicznych, w stanach subklinicznych [129, 130]. Szczep ten przyczynia się do występowania stanów zapalnych jelit [131] u prosiąt oraz warchlaków, powodując określone straty w hodowlach komercyjnych [10, 132, 133]. Potwierdzają to wyniki badań metabolomicznych [9], podczas których stwierdzono, że w pierwszym okresie narażenia ma miejsce pobudzenie organizmu loszek, który to stan, w miarę upływu czasu, jest niwelowany w wyniku kompensacji czy uruchomienia mechanizmów adaptacyjnych.

W części zstępującej okrężnicy, w miarę trwania narażenia ZEN, liczba komórek mikrobioty jelitowej ma tendencję spadkową, tak w wypadku *E. coli,* jak i CNS [10]. Jest to sytuacja identyczna z wynikami wspomnianego mikrobiomu w kątnicy. Spadek wartości logarytmicznej mikrobioty dowodzi w sposób pośredni, że możliwość fizjologicznego rozprzestrzeniania się gronkowców z udziałem ZEN zanika [134]. Na drodze ekstrapolacji, można jedynie sugerować, że aktywność biologiczna wobec treści pokarmowej jest podobna do sytuacji w kątnicy. Po pierwsze, w dalszym ciągu ma miejsce mikrobiologiczna fermentacja RS [118], co prowadzi

do produkcji SCFA oraz do proliferacji komórek, zakwaszenia środowiska i innych sugerowanych wcześniej korzyści [125]. Prawdopodobnie, w to wszystko włącza się, aktywność bakteriostatyczna ZEN [120]. Z kolei fizjologiczny hipoestrogenizm loszek oraz toczących się procesów biotransformacji ZEN, powoduje dużo późniejsze docieranie ZEN do dystalnych odcinków jelit [46], w wartościach istotnych wobec drobnoustrojów tam obecnych. Podobnie jak w kątnicy, powstaje swego rodzaju obrót zamknięty. Polega on na spadku wartości logarytmicznych mikrobiomu spowodowany ZEN, co zmniejsza liczbę SPCA. To z kolei przyczynia się do zachwiania procesów eubiozy [124, 135], tym razem w okrężnicy zstępującej. Stopień dysbiozy jest jednak nieznaczny lub wręcz niezauważalny z dwóch powodów: z racji braku jakichkolwiek objawów klinicznych oraz krótkiego czasu trwania narażenia niskimi dawkami ZEN.

Trwająca mikotoksykoza zearalenonowa stymuluje rozwój *C. difficile* proporcjonalnie nawet w przypadku niskich dawek ZEN [116]. Pamiętając, że jest to szczep oportunistyczny, to z najnowszych doniesień [133] wynika, że w sytuacjach niesprzyjających może być przyczyną stanów zapalnych jelit w hodowlach komercyjnych, u urodzonych prosiąt oraz w okresie tuczu wstępnego, powodując określone straty [132]. Możliwe, że dawki ZEN w wartościach NOAL i niskich dawkach LOAEL, są inhibitorami ekspresji mRNA obu syntaz tlenku azotu, czyli ma miejsce wstrzymanie procesów zapalnych w przewodzie pokarmowym, co może być czynnikiem promującym rozwój niektórych mikroorganizmów jelitowych [51]. Wynika, że podczas NOAEL-owej i niskodawkowej LOAEL-owej mikotoksykozy zearalenonowej ma miejsce kompromis, pomiędzy:

- „użyteczną" (zwiększona przepuszczalność ścian jelit) funkcją bariery jelitowej [64] w wyniku zwiększonego udziału β-ZEL;
- syntezą korzystnych składników odżywczych i białek;
- poprawionym poborem energii ze składników diety o niskim potencjale wewnętrznym (RS) – a „szkodliwymi" skutkami zapalenia i subklinicznymi patologiami [136].

Z dostępnych opracowań wynika, że w okrężnicy ma miejsce zwiększona aktywność życiowa poszczególnych szczepów bakteryjnych, ale w różnych terminach narażenia [10, 116]. W przypadku *E. coli* i *E. faecalis* stwierdzono ją w pierwszych dniach narażenia, zaś w przypadku *C. difficile* dopiero po kilkunastu dniach [10]. Wynika to prawdopodobnie z faktu, że ZEN w swej biologicznej (toksykologicznej) aktywności, jako substancja niepożądana, osiąga swe apogeum wysycenia tkanek jelit, w pierwszych kilku dniach narażenia [46]. W kolejnych terminach prawdopodobnie zaczyna dominować proces „niedostrzegania obecności ZEN" na zasadzie tolerancji pokarmowej [130] i braku reakcji ze strony układu pokarmowego, co częściowo dowodzi ta różnorodność funkcjonalna mikrobioty jelitowej [19]. W przypadku CNS, przebieg procesu zmienności między oboma badanymi odcinkami dwunastnicy a kątnicą i okrężnicą zstępującą, był podobny jak w dwóch poprzednich mikrobiotach [10]. Z indeksu dysbiozy mikrobioty wynikało [10], że dawka MABEL jest najbliżej jedności (eubioza), a w pierwszych trzech odcinkach jelit, znacznie je przekracza. Stwierdzono, że dawka MABEL działa stymulująco na oceniane mikrobioty, czego nie stwierdzano przy wyższych dawkach narażenia [10]. Przedstawiona sytuacja koreluje z paradygmatem hormezy [7], czyli zmienność akcji zależnie od dawki.

Po trzytygodniowym narażeniu ZEN, procesy interakcji z *E. coli* i *E. faecalis* przebiegały znacznie łagodniej [10]. Stwierdzono również różnice między pierwszymi trzema odcinkami jelit (jelito cienkie) a dwoma końcowymi (jelito grube). W przypadku *E. coli* nastąpił wzrost wartości indeksu dysbiozy, co mogłoby mieć miejsce podczas „wstępnej" fermentacji węglowodanów [128]. Upływ czasu powodował jednak spadek wartości indeksu dysbiozy w przypadku *E. faecalis*, do wartości poniżej 1. Odnośnie *C. difficile* to, wyższe dawki były czynnikiem stymulującym namnażanie się tej bakterii. Przedstawiony efekt jest przeciwstawny, wobec wyników prezentowanych przez innych autorów stosujących parokrotnie wyższe dawki ZEN [116]. Z obserwacji Cieplińskiej i wsp. [10] wynika, że niskie dawki ZEN, a szczególnie na poziomach NOAEL i mniejszym, działają antybiotyko-podobnie [121, 137]. To znaczy, że wysokie dawki ZEN, działają toksycznie. Niskie dawki, działają stymulująco na rozwój nie tylko makroorganizmu (prawdopodobnie z racji większego udziału β-ZEL), ale głównie na mikroorganizmy które „nie dostrzegają" jego obecności [68].

Podczas długoterminowego narażenia [10], różnice funkcjonalnej mikrobiomu stwierdzono jedynie u trzech z nich – *E. coli*, *E. faecalis* oraz *C. difficile*. Inny przebieg funkcjonalny miał miejsce przy dawce MABEL. Ta odrębność polegała na tym, że w opuszce dwunastnicy wartości log CFU/g były wyższe, tak w przypadku równoległych terminów narażenia, jak i wartości we wcześniejszych terminach. Odnośnie *E. faecalis*, forma przebiegu różnorodności funkcjonalnej tego rodzaju była niemal identyczna. Różnice aktywności funkcjonalnej dotyczą różnic, w dawkach narażenia między wartościami w jelicie cienkim a jelicie grubym. W przypadku *C. difficile* stwierdzono ich obecność już w opuszce dwunastnicy przy braku ich w grupie kontrolnej. Zaistniała sytuacja, była prawdopodobnie wynikiem wzmożonej miejscowej fermentacji bakteryjnej [126].

7. Zmienność mykobioty jelitowej

Z przeglądu dostępnego piśmiennictwa wynika, że prace nad charakterystyką mykobioty u zwierząt są ograniczone. Do tej pory badania, które dotyczyły scharakteryzowania flory grzybiczej, koncentrowały się na przewodzie pokarmowym [138], ale części dystalnej. Podobnie jak w badaniach mikrobioty, różnorodność mykobioty jelitowej różni się znacznie, w zależności od miejsca jej występowania. Najczęściej stwierdza się obecność *Candida* spp. i *Fusarium* spp. Co ciekawe, wykazano, że ilość i rodzaj grzybów obecnych w określonej przestrzeni anatomicznej jest zmienna [4, 10].

Z badań Cieplińskiej i wsp. [10] wynika, że po 42-dniowym okresie narażenia ZEN, w dystalnych odcinkach jelit toksyna działa sprzyjająco na obecność drożdżaków w jelicie grubym. Jest to sytuacja niekorzystna dla makroorganizmu. Wynika to z faktu, że ma miejsce ujemna korelacja z dietą bogatą w aminokwasy, kwasy tłuszczowe i białka [138]. Podobnie niskie wartości stwierdzono w przypadku *Fusarium* spp., również po kilkudniowym narażeniu ZEN i też w dystalnych odcinkach jelit.

Równolegle dokonano oceny [10] stopnia skolonizowania jelit przez mykobiotę, jakim jest *Fusarium* spp. Stwierdzono, że to przy dawce NOAEL i niskiej dawce LOAEL, w miarę przesuwania się treści pokarmowej, następował wzrost wartości logarytmicznej *Fusarium* spp., od 0 do 12 jednostek (interakcja synergistyczna). W przypadku dawki MABEL, w zasadzie nie stwierdzano obecności tych grzybów, podobnie jak w grupie C.

8. Genotoksyczność

Z jednej strony, kątnica jest miejscem, gdzie u młodych loszek kumulują się przyczyny dysfunkcji jelit [121]. Z drugiej strony, ZEN i jego metabolity (α- i β-zearalenol), legitymują się aktywnością podobną do endogennych estrogenów. Te ostatnie, są powszechnie uznawane za czynniki ryzyka raka wybranych odcinków jelit [139], piersi [140], macicy [8] i innych docelowych narządów estrogeno-wrażliwych, z racji wielokierunkowych właściwości tychże sterydów [141], czy związków chemicznych sterydopodobnych [19]. Coraz więcej wyników badań wskazuje, że metabolity katecholowe E2/E1 są słabymi genotoksynami, przyczyniając się do efektu nowotworowego poprzez tworzenie chinonów, które generują addukty DNA [142]. W przypadku mikoestrogenu, jakim jest ZEN i głównych jego metabolitów stwierdzono, że tworzenie katecholi jest głównym szlakiem metabolicznym ZEN u wielu gatunków ssaków [11, 143], w tym ludzi [90]. Stąd można przypuszczać, że nawet w niewielkich dawkach ZEN może być czynnikiem genotoksycznym, np. w treści kątniczej (*caecal water*) [3, 11, 73, 144].

Selektywne dawki ZEN, zastosowane w jednym z doświadczeń [11], w każdym z przedziałów swych wartości (MABEL, NOAEL i niska dawka LOAEL), potwierdziły słuszność założeń, co do istoty wartości dawki narażenia. Dowodem na tego rodzaju stwierdzenie, był wzrost genotoksyczności w miarę trwania narażenia proporcjonalnie do stężenia mikotoksyny. Z tym, że procent udziału DNA w ogonie i rozkład komórek LLC-PK1 (*porcine kidney epithelial cell line*) przy dawce MABEL, w ogonie komety, był bardzo mały i zbieżny z grupą kontrolną. W efekcie postawiono tezę, o braku genotoksyczności przy dawce MABEL [11].

Współczynniki korelacji r-Pearsona, czyli stosunek procentowy udziału komórek z uszkodzonym DNA do procentu uszkodzeń DNA w komórce, układał się podobnie [11]. Początkowo, wartość współczynnika korelacji przy dawce MABEL był tożsamy z grupą kontrolną. Potwierdza to hipotezę niedostrzeganiu przez organizm obecność ZEN i jego metabolitów (jak w teorii limfocytów T-regs, polegającej na braku reakcji limfocytów T regulatorowych, w sytuacji przedostania się do organizmu, małej liczby czynników zakaźnych [21]). „Dostrzeżenie" nastąpiło dopiero w siódmym tygodniu narażenia. Prawdopodobnie, zaproponowana dawka MABEL znalazła się w obrębie, tzw. wartości granicznej [73, 145]. Równolegle, organizm niedojrzałych płciowo loszek, ma duży popyt na estrogeny [19]. W związku z tym, mikoestrogen, został prawdopodobnie „wykorzystany" do potrzeb własnych organizmu loszek, czyli spełnił tzw. działanie ochronno/uzupełniające. Jak również, należałoby mieć na uwadze fakt, zwiększonego udziału β-ZEL wśród powstałych metabolitów, który wykazuje się mniejszą toksycznością [38].

Uzyskane wartości współczynnika korelacji r-Pearsona [11], w początkowym okresie narażenia, przy wyższych dawkach ZEN, wskazały na sytuację odmienną, czyli hiperestrogenizm (estrogen endogenny + „wolny" ZEN). Stan ten powodował, zwiększony udział komet, o dużo dłuższych ogonach i małych głowach. Wynika z tego, że już dawka NOAEL indukuje genotoksyczność treści kątniczej, która jest poprzedzana uszkodzeniami oksydacyjnymi oraz dysfunkcją wrzeciona mitotycznego [142]. Sprawdzane w treści kątniczej dawki NOAEL i niskie dawki LOAEL, są wartościami genotoksycznymi, lecz o umiarkowanym współczynniku korelacji

i z tendencją spadkową [11]. Również histogramy rozkładu endogennych uszkodzeń DNA w treści kątniczej u loszek narażonych ZEN w dawkach MABEL, NOAEL i niskiej dawce LOAEL różnią się.

Procesy genotoksyczne w treści kątniczej, przy wyższych dawkach są początkowo silniej wyrażone i mogą prowokować nawet objawy kliniczne [3]. W dłuższych terminach narażenia procesy genotoksyczne są w dalszym ciągu dużo słabiej wyrażone przy MABEL. Sytuacja ta może być wynikiem przenoszeniem ZEN do innych tkanek niż jelito [46], uruchomieniem procesów biotransformacji typu detoksykacyjnego przez makroorganizm [36], przesunięciem ilościowym mikrobioty jelitowej do końcowych odcinków części dystalnej jelit [4, 10], ale również w wyniku konwersji zmodyfikowanych mikotoksyn, do wolnej formy w jelicie grubym [8].

9. Przyrosty

Z badań Marin i wsp. [55] wynika, że ZEN nie wpływa na masę ciała, średni dzienny przyrost czy żerność świń. Inni badacze dowodzą przeciwnie, że ZEN ma wpływ na przyrosty masy ciała [19, 49, 58, 146] lub wybranych tkanek [108, 147] zwierząt pobierających paszę zanieczyszczoną tą mikotoksyną [56]. Większość z nich uznaje, że zdrowy przewód pokarmowy gwarantuje dobrostan i zdrowie tak u zwierząt, jak i u ludzi [19]. W zdrowym przewodzie pokarmowym młodych niedojrzałych płciowo organizmów, dominują aktywne komórki i tkanki o dużych możliwościach obrotu metabolicznego białka [24, 56]. Wzmożenie procesów metabolicznych, udokumentowane w różnych pracach [19, 49, 56] potwierdziły sugestie, że substancje endo- i egzogenne o właściwościach estrogeno-podobnych, w małych dawkach są czynnikiem stymulującym procesy proliferacji [68, 120]. Efektem narażania loszek niskimi dawkami ZEN, jest jego bezpośredni kontakt z błoną śluzową jelit po pobraniu pasz przez zwierzęta [64, 148], stąd tempo wzrostu zwierząt doświadczalnych było większe. Stwierdzono, że wzrost przyrostów masy ciała miał miejsce głównie po 28 dniach narażenia. Wartości przyrostów masy ciała uzyskiwane w grupach doświadczalnych były jednak jednostajnie wyższe, co potwierdzałoby znaczenie efektu małych dawek ZEN [7, 9, 49] – substancji niepożądanej o właściwościach sterydo-podobnych, stymulującej przyrosty masy ciała niedojrzałych płciowo loszek.

10. Podsumowanie

W przedstawionym opracowaniu próbowano udokumentować, że wiedza o wpływie bardzo niskich dawek ZEN i jego metabolitów na organizmy ssaków in vivo, jest w zasadzie zróżnicowana i mało znana. Odpowiedź niedojrzałych płciowo loszek narażonych niskimi dawkami ZEN, przebiega odmiennie. Jednym z pierwszych biomarkerów, mógłby być wynik stosunku ilościowego α-ZEL do β-ZEL, gdzie dominatem jest β-ZEL. Jest to sytuacja odmienna, w porównaniu z innymi przedziałami wiekowymi samic. Efekt tego jest wieloznaczny, ponieważ β-ZEL przyczynia się do pewnego zwiększania przyrostów masy ciała, ale równocześnie spowalnia dojrzewanie płciowe niedojrzałych płciowo loszek. Początkowo ma miejsce bardzo niski poziom ZEN i brak metabolitów w surowicy krwi (szczególnie przy dawce MABEL), co potwierdza duże fizjologiczne zapotrzebowanie ich organizmu na egzogenne substancje estrogeno-podobne. Substancje te, są maksymalnie wykorzystane przez nie. Nadmiar przy wyższych dawkach powoduje występowanie tzw. wolnego ZEN, który spełnia inną, nie zawsze pozytywną rolę. Proporcjonalnie do dawki ZEN, wzrasta poziom E2

i „wolnego ZEN". Duet ten, wpływa supresyjnie na wartości stężeń P4 i T. Równocześnie, z wyników profilu metabolicznego wynika, że ma miejsce wzmożona utrata energii i białka (jako wynik pobudzenia), co sugeruje o efektywniejszym wykorzystaniu paszy i zaangażowaniu w procesy biotransformacyjno-detoksykacyjne. Zmiany aktywności profilu metabolicznego mają przebieg falowy. W pierwszym okresie narażenia, jest on dość wysoki co może wynikać również z efektu kompensacji. Po nim ma miejsce uruchomienie mechanizmów adaptacyjnych (tonizujących), z powodu trwających w dalszym ciągu procesów energochłonnych. Może również, być prowokowana przez zwiększenie udziału β-ZEL, w końcowym procesie biotransformacji. Metabolit ten, sam nie jest toksyczny, ale wspomaga procesy metaboliczne oraz w pierwszym okresie narażenia przyczynia się do wzrostu wartości przeznabłonkowego oporu elektrycznego (TER – *trans-epithelial electric resistance*) uszczelniając jelita, a w późniejszych terminach poziom TER jednoznacznie spada. Towarzyszy temu przesunięcie ilościowe mikrobiomu do części dystalnej jelit. Oba te stany, sprowokowane przez ZEN i jego metabolity przyczyniają się do lepszego wchłaniania substancji odżywczych w części proksymalnej a procesy fermentacyjne wraz z odżywczymi w części dystalnej. W sytuacji zachwiania równowagi (terminu „szczelności" jelit i przesunięć mikrobiotu jelitowego do części dystanej), może wywołać dysbiozę jelitową. Ponadto, ZEN jest genotoksyczny, z jednym wyjątkiem. Tym wyjątkiem jest dawka MABEL, gdzie genotoksyczność jest na tym samym poziomie, jak u niedojrzałych płciowo loszek nienarażanych ZEN.

11. Wnioski

Przedstawione wyniki, wybranych badań diagnostycznych (jak np., poziom β-ZEL, poziom białek i związków energetycznych w surowicy krwi, czy poziomy wybranych hormonów sterydowych), mogą być sugerowane jako biomarkery niskodawkowej długotrwałej mikotoksykozy zearalenonowej u niedojrzałych płciowo loszek, w ramach precyzyjnej medycyny weterynaryjnej.

Ponadto, rodzi się pytanie – czy eliminować lub detoksykować ziarna zbóż, wykorzystywanych do produkcji pasz, ale zanieczyszczonych tak niskimi dawkami ZEN? Prawdopodobnie, korzystniej byłoby zostawić tę mikotoksynę traktując ją jako, naturalny czynniki wchodzący w pozytywną interakcję z organizmem niedojrzałych płciowo loszek.

Literatura:

1. Thielecke F., Nugent A.P., *Contaminants in Grain – A Major Risk for Whole Grain Safety?*, Nutrients, 10, 2018, s. 1213, doi:10.3390/nu10091213.
2. Fleetwood J., Rahman S., Holland D., Millson D., Thomson L., Poppy G., *As clean as they look? Food hygiene inspection scores, microbiological contamination, and foodborne illness*, Food Control, 96, 2019, s. 76-86, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2018.08.034.
3. Alassane-Kpembi I., Pinton P., Oswald I.P., *Effects of Mycotoxins on the Intestine*, Toxins, 11, 2019, s. 159, doi:10.3390/toxins11030159.
4. Piotrowska M., Sliżewska K., Nowak A., Zielonka Ł., Żakowska Z., Gajęcka M., Gajęcki M., *The effect of experimental fusarium mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents*, Toxins, 6, 2014, s. 2064-2081, doi: 10.3390/toxins6072064.
5. Zachariasova M., Dzumana Z., Veprikova Z., Hajkovaa K., Jiru M., Vaclavikova M., Zachariasova A., Pospichalova M., Florian M., Hajslova J., *Occurrence of multiple mycotoxins in European feeding stuffs, assessment of dietary intake by farm animals*, Animal Feed Science and Technology, 193, 2014, s. 124-140, https://doi.org/10.1016/j.

anifeedsci.2014.02.007.
6. Knutsen H.-K., Alexander J., Barregård L., Bignami M., Brüschweiler B., Ceccatelli S., Cottrill B., Dinovi M., Edler L., Grasl-Kraupp B., Hogstrand C., Hoogenboom L., Nebbia C.S., Petersen A., Rose M., Roudot A.-C., Schwerdtle T., Vleminckx C., Vollmer G., Wallace H., Dall'Asta C., Dänicke S., Eriksen G.-S., Altieri A., Roldán-Torres R., Oswald I.P., *Risks for animal health related to the presence of zearalenone and its modified forms in feed*, EFSA Journal, 15(7), 2017, s. 4851, doi: 10.2903/j.efsa.2017.4851.
7. Calabrese E.J., *Hormesis: Path and Progression to Significance*, International Journal of Molecular Science, 19, 2018, s. 2871, doi:10.3390/ijms19102871.
8. Freire L., Sant'Ana A.S., *Modified mycotoxins: An updated review on their formation, detection, occurrence, and toxic effects*, Food and Chemical Toxicology, 111, 2018, s. 189-205, https://doi.org/10.1016/j.fct.2017.11.021.
9. Rykaczewska A., Gajęcka M., Dąbrowski M., Wiśniewska A., Szcześniewska J., Gajęcki M.T., Zielonka Ł., *Growth performance, selected blood biochemical parameters and body weight of pre-pubertal gilts fed diets supplemented with different doses of zearalenone (ZEN)*, Toxicon, 152, 2018, s. 84-94, https://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.07.013.
10. Cieplińska K., Gajęcka M., Dąbrowski M., Rykaczewska A., Zielonka Ł., Lisieska-Żołnierczyk S., Bulińska M., Gajęcki M.T., *Time-dependent changes in the intestinal microbiome of gilts exposed to low zearalenone doses*, Toxins, 11, 2019, s. 296, doi:10.3390/toxins11050296.
11. Cieplińska K., Gajęcka M., Nowak A., Dąbrowski M., Zielonka Ł., Gajęcki M.T., *The gentoxicity of caecal water in gilts exposed to low doses of zearalenone*, Toxins, 10(9), 2018, s. 350, https://doi.org/10.3390/toxins10090350.
12. Gajęcka M., Waśkiewicz A., Zielonka Ł., Goliński P., Rykaczewska A., Lisieska-Żołnierczyk S., Gajęcki M.T., *Mycotoxin levels in the digestive tissues of immature gilts exposed to zearalenone and deoxynivalenol*, Toxicon, 153, 2018, s. 1-11, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.08.002.
13. Tebani A., Afonso C., Marret S., Bekri S., *Omics-Based Strategies in Precision Medicine: Toward a Paradigm Shift in Inborn Errors of Metabolism Investigations*, International Journal of Molecular Science, 17, 2016, s. 1555, doi:10.3390/ijms17091555.
14. Celi P., Verlhac V., Pérez C.E., Schmeisser J., Kluenter A.M., *Biomarkers of gastrointestinal functionality in animal nutrition and health*, Animal Feed Science and Technology, 250, 2019, s. 9-31, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2018.07.012.
15. Velmurugan B.K., Rathinasamy B., Lohanathan B.P., Thiyagarajan V., Weng C.F., *Neuroprotective Role of Phytochemicals*, Molecules, 23, 2018, s. 2485, doi:10.3390/molecules23102485.
16. Zhang Q., Caudle W.M., Pi J., Bhattacharya S., Andersen M.E., Kaminski N.E., Conolly R.B., *Embracing systems toxicology at single-cell resolution*, Current Opinion of Toxicology, 16, 2019, s. 49-57, https://doi.org/10.1016/j.cotox.2019.04.003.
17. Gajęcka M., Otrocka-Domagała I., *Immunocytochemical expression of 3β- and 17β-hydroxysteroid dehydrogenase in bitch ovaries exposed to low doses of zearalenone*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 16(1), 2013, s. 55-62, DOI 10.2478/pjvs-2013-0008.
18. Gajęcka M., *The effect of low-dose experimental zearalenone intoxication on the immunoexpression of estrogen receptors in the ovaries of pre-pubertal bitches*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 15(4), 2012, s. 685-691, DOI 10.2478/v10181-012-0106-3.
19. Gajęcka M., Zielonka Ł., Gajęcki M., *Activity of zearalenone in the porcine intestinal tract*, Molecules, 22, 2017, s. 18, doi:10.3390/molecules22010018.
20. Dąbrowski M., Obremski K., Gajęcka M., Gajęcki M., Zielonka Ł., *Changes in the subpopulations of porcine peripheral blood lymphocytes induced by exposure to low doses of zearalenone (ZEN) and deoxynivalenol (DON)*, Molecules, 21, 2016, s. 557, doi:10.3390/molecules21050557.
21. Silva-Campa E., Mata-Haro V., Mateu E., Hernández J., *Porcine reproductive and respiratory syndrome virus induces CD4+CD8+CD25+Foxp3+ regulatory T cells*

(Tregs), Virology, 430, 2012, s. 73-80, doi: 10.1016/j.virol.2012.04.009.
22. Zielonka Ł., Jakimiuk E., Obremski K., Gajęcka M., Dąbrowski M., Gajęcki M., *An evaluation of the proliferative activity of immunocompetent cells in the jejunal and iliac lymph nodes of prepubertal female wild boars diagnosed with mixed mycotoxicosis*, Bulletin Veterinary Institute in Pulawy, 59, 2015, s. 197-203; DOI: 10.1515/bvip-2015-0030.
23. Bryden W.L., *Mycotoxin contamination of the feed supply chain: Implications for animal productivity and feed security*, Animal Feed Science and Technology, 173, 2012, s. 134-158, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2011.12.014.
24. Grenier B., Applegate T.J., *Modulation of intestinal functions following mycotoxin ingestion: meta-analysis of published experiments in animals*, Toxins, 5, 2013, s. 396-430, https://doi.org/10.3390/toxins5020396.
25. Gajęcka M., Zielonka Ł., Gajęcki M., *The effect of low monotonic doses of zearalenone on selected reproductive tissues in pre-pubertal female dogs – a review*, Molecules, 20, 2015, s. 20669-20687, doi:10.3390/molecules201119726.
26. Stopa E., Babińska I., Zielonka Ł., Gajęcki M., Gajęcka M., *Immunohistochemical evaluation of apoptosis and proliferation in the mucous membrane of selected uterine regions in pre-pubertal bitches exposed to low doses of zearalenone*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 19(1), 2016, s. 175-186, DOI: 10.1515/pjvs-2016-0022.
27. Kramer H.J., van den Ham W.A., Slob W., Pieters M.N., *Conversion Factors Estimating Indicative Chronic No-Observed-Adverse-Effect Levels from Short-Term Toxicity Data*, Regulatory Toxicology and Pharmacology, 23, 1996, s. 249-255.
28. Pastoor T.P., Bachman A.N., Bell D.R., Cohen S.M., Dellarco M., Dewhurst I.C., Doe J.E., Doerrer N.G., Embry M.R., Hines R.N., Moretto A., Phillips R.D., Rowlands J.C., Tanir J.Y., Wolf D.C., Boobis A.R., *A 21st century roadmap for human health risk assessment*, Critical Reviews in Toxicology, 44, 2014, s. 1-5, https://doi.org/10.3109/10408444.2014.931923.
29. Suh H.Y., Peck C.C., Yu K.S., Lee H., *Determination of the starting dose in the first-in-human clinical trials with monoclonal antibodies: a systematic review of papers published between 1990 and 2013*, Drug Design, Development and Therapy, 10, 2016, s. 4005-4016, http://dx.doi.org/10.2147/DDDT.S121520.
30. Vandenberg L.N., Colborn T., Hayes T.B., Heindel J.J., Jacobs D.R., Lee D.-H., Shioda T., Soto A.M., vom Saal F.S., Welshons W.V., Zoeller R.T., Myers J.P., *Hormones and endocrine-disrupting chemicals: low-dose effects and nonmonotonic dose responses*, Endocrine Reviews 33, 2012, s. 378-455, doi: 10.1210/er.2011-1050.
31. Dana D., Gadhiya S.V., Surin L.G.S., Li D., Naaz F., Ali Q., Paka L., Yamin M.A., Narayan M., Goldberg I.D., Narayan P., *Deep Learning in Drug Discovery and Medicine; Scratching the Surface*, Molecules, 23, 2018, s. 2384, doi:10.3390/molecules23092384.
32. Gupta R.C., *Biomarkers in Toxicology*, Academic Press, USA, 2019, Chapter 1 – Introduction, s. 3-5, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814655-2.00001-3
33. Hickey G.L., Craig P.S., Luttik R., de Zwart D., *On the quantification of intertest variability in ecotoxicity data with application to species sensitivity distributions*, Environmental Toxicology and Chemistry, 31(8), 2012, s. 1903-1910, https://doi.org/10.1002/etc.1891.
34. Pinton P., Suman M., Buck N., Dellafiora L., De Meester J., Stadler D., Rito E., *Practical guidance to mitigation of mycotoxins during food processing. Report commissioned by the process-related compounds and natural toxins task force*, ILSI Europe, Report Series, 2019, ISBN: 9789078637455, https://www.researchgate.net/publication/336533566.
35. Zheng W., Feng N., Wang Y., Noll L., Xu S., Liu X., Lu N., Zou H., Gu J., Yuan Y., Liu X., Zhu G., Bian J., Bai J., Liu Z., *Effects of zearalenone and its derivatives on the synthesis and secretion of mammalian sex steroid hormones: A review*, Food and Chemical Toxicology, 126, 2019, s. 262-276, https://doi.org/10.1016/j.fct.2019.02.031.
36. Rykaczewska A., Gajęcka M., Onyszek E., Cieplińska K., Dąbrowski M., Lisieska-Żołnierczyk S., Bulińska M., Babuchowski A., Gajęcki M.T., Zielonka Ł., *Imbalance*

in the Blood Concentrations of Selected Steroids in Prepubertal Gilts Depending on the Time of Exposure to Low Doses of Zearalenone, Toxins, 11, 2019, 561, doi:10.3390/toxins11100561.
37. Lawrenz B., Melado L., Fatemi H., *Premature progesterone rise in ART-cycles*, Reproductive Biology, 18(1), 2018, s. 1-4, https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.01.001.
38. Bryła M., Waśkiewicz A., Ksieniewicz-Woźniak E., Szymczyk K., Jędrzejczak R., *Modified Fusarium Mycotoxins in Cereals and Their Products – Metabolism, Occurrence, and Toxicity: An Updated Review*, Molecules, 23, 2018, s. 963, doi:10.3390/molecules23040963.
39. Kowalska K., Habrowska-Górczyńska D.E., Piastowska-Ciesielska A., *Zearalenone as an endocrine disruptor in humans*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 48, 2016, s. 141-149, http://dx.doi.org/10.1016/j.etap.2016.10.015.
40. Yang D., Jiang T., Lin P., Chen H., Wang L., Wang N., Zhao F., Tang K., Zhou D., Wang A., Jin Y., *Apoptosis inducing factor gene depletion inhibits zearalenone-induced cell death in a goat Leydig cell line*, Reproductive Toxicology, 67, 2017, s. 129-139, https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2016.12.005.
41. Benagiano M., Bianchi P., D'Elios M.M., Brosens I., Benagiano G., *Autoimmune diseases: Role of steroid hormones*, Best Practice & Research: Clinical Obstetrics & Gyneacology, 2019, https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2019.03.001.
42. Gajęcka M., Rybarczyk L., Zwierzchowski W., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K., Gajęcki M., *The effect of experimental, long-term exposure to low-dose zearalenone mycotoxicosis on the histological condition of ovaries in sexually immature gilts*, Theriogenology, 75, 2011, s. 1085-1094, doi:10.1016/j.theriogenology.2010.11.017.
43. Schoevers E.J., Santos R.R., Colenbrander B., Fink-Gremmels J., Roelen B.A.J., *Transgenerational toxicity of Zearalenone in pigs*, Reproductive Toxicology, 34, 2012, s. 110-119, http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2012.03.004.
44. Hennig-Pauka I., Koch F.J., Schaumberger S., Woechtl B., Novak J., Sulyok M., Nagl V., *Current challenges in the diagnosis of zearalenone toxicosis as illustrated by a field case of hyperestrogenism in suckling piglets*, Porcine Health Management, 4(18), 2018, s. 1-9, https://doi.org/10.1186/s40813-018-0095-4.
45. He J., Wei C., Li Y., Liu Y., Wang Y., Pan J., Liu J., Wu Y., Cui S., *Zearalenone and alpha-zearalenol inhibit the synthesis and secretion of pig follicle stimulating hormone via the non-classical estrogen membrane receptor GPR30*, Molecular and Cellular Endocrinology, 461, 2018, s. 43-54, https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.08.010.
46. Zielonka Ł., Waśkiewicz A., Beszterda M., Kostecki M., Dąbrowski M., Obremski K., Goliński P., Gajęcki M., *Zearalenone in the Intestinal Tissues of Immature Gilts Exposed per os to Mycotoxins*, Toxins 7, 2015, s. 3210-3223, doi:10.3390/toxins7083210.
47. Gajęcka M., Dabrowski M., Otrocka-Domagała I., Brzuzan P., Rykaczewska A., Cieplińska K., Barasińska M., Gajęcki M.T., Zielonka Ł., *Correlations between exposure to deoxynivalenol and zearalenone and the immunohistochemical expression of estrogen receptors in the intestinal epithelium and the mRNA expression of selected colonic enzymes in pre-pubertal gilts*, Toxicon, 173, 2020, s. 75-93, https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2019.11.006.
48. Demaegdt H., Daminet B., Evrard A., Scippo M.L., Muller M., Pussemier L., Callebaut A., Vandermeiren K., *Endocrine activity of mycotoxins and mycotoxin mixtures,* Food and Chemical Toxicology, 96, 2016, s. 107-116, http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2016.07.033.
49. Gajęcka M., Sławuta P., Nicpoń J., Kołacz R., Kiełbowicz Z., Zielonka Ł., Dąbrowski M., Szweda W., Gajęcki M., Nicpoń J., *Zearalenone and its metabolites in the tissues of female wild boars exposed per os to mycotoxins,* Toxicon, 114, 2016, s. 1-12, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.02.012.
50. Parveen M., Zhu Y., Kiyama R., *Expression profiling of the genes responding to zearalenone and its analogues using estrogen-responsive genes*, FEBS Letters, 583, 2009, s. 2377-2384, doi:10.1016/j.febslet.2009.06.035.

51. Gajęcka M., Stopa E., Tarasiuk M., Zielonka Ł., Gajęcki M., *The expression of type-1 and type-2 nitric oxide synthase in selected tissues of the gastrointestinal tract during mixed mycotoxicosis*, Toxins, 5(11), 2013, s. 2281-2292, doi:10.3390/toxins5112281.
52. Luisetto M., Almukhtar N., Ahmadabadi B.N., Hamid G.A., Mashori G.R., Khan K.R., Khan F.A., Cabianca L., *Endogenus Toxicology: Modern Physio – Pathological Aspects and Relationship with New Therapeutic Strategies. An Integrative Discipline Incorporating Concepts from Different Research Discipline Like Biochemistry, Pharmacology and Toxicology,* Journal of Clinical Pathology, 3(1), 2019, s. 000113, DOI: 10.29328/journal.acst.1001004.
53. Gajęcka M., Tarasiuk M., Zielonka Ł., Dąbrowski M., Nicpoń J., Baranowski M., Gajęcki M.T., *Changes in the metabolic profile and body weight of pre-pubertal gilts during prolonged monotonic exposure to low doses of zearalenone and deoxynivalenol*, Toxicon 125, 2017, s. 32-43, http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.007.
54. Goyarts T., Dänicke S., Brüssow K.-P., Valenta H., Ueberschär K.-H., Tiemann U., *On the transfer of the Fusarium toxins deoxynivalenol (DON) and zearalenone (ZON) from sows to their fetuses during days 35-70 of gestation*, Toxicology Letters, 171, 2007, s. 38-49, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2007.04.003.
55. Marin D.E., Pistol G.C., Neagoe I.V., Calin L., Taranu I., *Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets*, Food and Chemical Toxicology, 58, 2013, s. 408-415, https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.05.033.
56. Li Q., Patience J.F., *Factors involved in the regulation of feed and energy intake of pigs*, Animal Feed Science and Technology, 233, 2017, s. 22-33, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2016.01.001.
57. Fan Y.F., Yang Y.Y., Yang P., Xia T., Ma Y.X., *Available energy content, nutrients digestibility of chili meal and effects on performance of growing pigs*, Animal Feed Science and Technology, 229, 2017, s. 97-105, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.001.
58. Jiang S.Z., Yang Z.B., Yang W.R., Gao J., Liu F.X., Broomhead J., Chi F., *Effects of purified zearalenone on growth performance, organ size, serum metabolites, and oxidative stress in post weaning gilts*, Journal of Animal Science, 89, 2011, s. 3008-3015, doi:10.2527/jas.2010-3658.
59. Ingawale D.K., Mandlikb S.K., Naik S.R., *Models of hepatotoxicity and the underlying cellular, biochemical and immunological mechanism(s): A critical discussion*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 37, 2014, s. 118-133, doi:10.1016/j.etap.2013.08.015.
60. Maresca M., Fantini J., *Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases*, Toxicon, 56, 2010, s. 282-294, doi:10.1016/j.toxicon.2010.04.016.
61. Serrano A.B., Meca G., Font G., Ferrer E., *Risk assessment of beauvericin, enniatins and fusaproliferin present in follow-up infant formula by in vitro evaluation of the duodenal and colonic bioaccessibility*, Food Control, 42, 2014, s. 234-241, https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.02.014.
62. Przybylska-Gornowicz B., Tarasiuk M., Lewczuk B., Prusik M., Ziółkowska N., Zielonka Ł., Gajęcki M., Gajęcka M., *The Effects of Low Doses of Two Fusarium Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum*, A Light and Electron Microscopic Study. Toxins, 7, 2015, s. 4684-4705, doi:10.3390/toxins7114684.
63. Lewczuk B., Przybylska-Gornowicz B., Gajęcka M., Targońska K., Ziółkowska N., Prusik M., Gajęcki M., *Histological structure of duodenum in gilts receiving low doses of zearalenone and deoxynivalenol in feed*, Experimental and Toxicolgic Pathology, 68, 2016, s. 157-166, doi.org/10.1016/j.etp.2015.11.008.
64. Bertero A., Augustyniak J., Buzanska L., Caloni F., *Species-specific models in toxicology: in vitro epithelial barriers*, Environmental Toxicology and Pharmacology, 70, 2019, s. 103203, https://doi.org/10.1016/j.etap.2019.103203.

65. Wang J., Ji H.F., Hou C.L., Wang S.X., Zhang D.Y., Liu H., Shan D.C., Wang Y.M., *Effects of Lactobacillus johnsonii XS4 supplementation on reproductive performance, gut environment, and blood biochemical and immunological index in lactating sows*, Livestock Science, 164, 2014, s. 96-101, https://doi.org/10.1016/j.livsci.2014.03.008.
66. Guéchot J., Boisson R.C., Zarski J.P., Sturm N., Calès P., Lasnier E., *AST/ALT ratio is not an index of liver fibrosis in chronic hepatitis C when aminotransferase activities are determinate according to the international recommendations*, Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology, 37(5), 2013, s. 467-472, https://doi.org/10.1016/j.clinre.2013.07.003.
67. Steininger M., Winter M.P., Reiberger T., Koller L., El-Hamid F., Forster S., Schnaubelt S., Hengstenberg C., Distelmaier K., Goliasch G., Wojta J., Toma A., Niessner A., Sulzgruber P., *De-Ritis Ratio Improves Long-Term Risk Prediction after Acute Myocardial Infarction*, Journal of Clinical Medicine, 7, 2018, s. 474, doi:10.3390/jcm7120474.
68. Zhabinskii V.N., Khripach N.B., Khripach V.A., *Steroid plant hormones: Effects outside plant kingdom*, Steroids 97, 2015, s. 87-97, doi:10.1016/j.steroids.2014.08.025.
69. De Angelis E., Monaci L., Visconti A., *Investigation on the stability of deoxynivalenol and DON-3 glucoside during gastro-duodenal in vitro digestion of a naturally contaminated bread model food*, Food Control, 43, 2014, s. 270-275, doi:10.1016/j.foodcont.2014.03.032.
70. Gajęcka M., Przybylska-Gornowicz B., Zakłos-Szyda M., Dąbrowski M., Michalczuk L., Koziołkiewicz M., Babuchowski A., Zielonka Ł., Lewczuk B., Gajęcki M.T., *The influence of a natural triterpene preparation on the gastrointestinal tract of gilts with streptozocin-induced diabetes and on cell metabolic activity*, Journal of Functional Foods, 33, 2017, s. 11-20, http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.03.019.
71. Aouacheri O., Saka S., Krim M., Messaadia A., Maidi I., *The Investigation of the Oxidative Stress-Related Parameters in Type 2 Diabetes Mellitus*, Canadian Journal of Diabetes, 39, 2015, s. 44-49, DOI: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcjd.2014.03.002.
72. Alonso-Pozos I., Rosales-Torres A.M., Avalos-Rodriguez A., Vergara-Onofre M., Rosado-Garcia A., *Mechanism of granulosa cell death during follicular atresia depends on follicular size*, Theriogenology, 60, 2003, s. 1071-1081, doi:10.1016/S0093-691X(03)00123-7.
73. Fleck S.C., Hildebrand A.A., Müller E., Pfeiffer E., Metzler M., *Genotoxicity and inactivation of catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone*, Mycotoxin Research, 28, 2012, s. 267-273, DOI 10.1007/s12550-012-0143-x.
74. Wang J.J., Wei ZK., Han Z., Liu Z.Y., Zhu X.Y., Li X.W., Wang K., Yang Z.T., *Zearalenone Induces Estrogen-Receptor-Independent Neutrophil Extracellular Trap Release In Vitro*, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 67(16), 2019, s. 4588-4594, https://doi.org/10.1021/acs.jafc.8b05948.
75. Texada M.J., Malita A., Christensen C.F., Dall K.B., Faergeman N.J., Nagy S., Halberg K.A., Rewitz K., *Autophagy-Mediated Cholesterol Trafficking Controls Steroid Production*, Developmental Cell, 48(5), 2019, s. 659-671, https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.01.007.
76. Küskü-Kiraz Z., Genc S., Bekpınar S., Ünlücerci Y., Çevik A., Olgaç V., Gürdöl F., Uysal M., *Effects of betaine supplementation on nitric oxide metabolism, atherosclerotic parameters, and fatty liver in guinea pigs fed a high cholesterol plus methionine diet,* Nutrition, 45, 2018, s. 41-48, https://doi.org/10.1016/j.nut.2017.07.005.
77. Koopmans S.J., Schuurman T., *Considerations on pig models for appetite, metabolic syndrome and obese type 2 diabetes: from food intake to metabolic disease*, European Journal of Pharmacology, 759, 2015, s. 231-239, https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2015.03.044.
78. Zheng W., Wang B., Li X., Wang T., Zou H., Gu J., Yuan Y., Liu X., Bai J., Bian, J., Liu Z., *Zearalenone Promotes Cell Proliferation or Causes Cell Death?,* Toxins, 10, 2018, s. 184, doi:10.3390/toxins10050184.
79. Zhou G., Fu W., *Total serum bilirubin levels and sensor neural hearing loss in the US*

adolescents: NHANES 2007-2010. International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology, 105, 2018, s. 20-26, https://doi.org/10.1016/j.ijporl.2017.12.001.
80. Jafari B., Ospanov M., Ejaz S.A., Yelibayeva N., Khan S.U., Amjad S.T., Safarov S., Abilov Z.A., Turmukhanova M.Z., Kalugin S.N., Ehlers P., Lecka J., Sévigny J., Iqbal J., Langer P., *2-Substituted 7-trifluoromethyl-thiadiazolopyrimidones as alkaline phosphatase inhibitors. Synthesis, structure activity relationship and molecular docking study*, European Journal of Medicinal Chemistry, 144(20), 2018, s. 116-127, https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.11.068.
81. Chirambo G.M., Niekerk Ch., Crowther N.J., *The role of alkaline phosphatase in intracellular lipid accumulation in the human hepatocarcinoma cell line, HepG2*, Experimental and Molecular Pathology, 102(2), 2017, s. 224-229, https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2017.02.007.
82. Kim J.C., Wilcock P., Bedford M.R., *Iron status of piglets and impact of phytase superdosing on iron physiology: A review*, Animal Feed Science and Technology, 235, 2018, s. 8-14, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.11.001.
83. Etim N.A.N., Offiong E.E.A., Williams M.E., *Asuquo L.E., Influence of nutrition on blood parameters of pigs*, American Journal of Biology and Life Sciences, 2(2), 2014, s. 46-52, http://www.openscienceonline.com/journal/ajbls.
84. Etim N.N., Williams M.E., Akpabio U., Offiong E.E., *Haematological parameters and factors affecting their values*, Agricultural Sciences, 2(1), 2014, s. 37-47, http://dx.doi.org/10.12735/as.v2i1p37.
85. Gajęcki M., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E., Obremski K., *Zearalenone as a potential allergen in the alimentary tract – a review*, Polish Journal of Food and Nutrition Sciences, 15/56(3), 2006, s. 263-268.
86. Elegido A., Graell M., Andrés P., Gheorghe A., Marcos A., Nova E., *Increased naive CD4+ and B lymphocyte subsets are associated with body mass loss and drive relative lymphocytosis in anorexia nervosa patients*, Nutrition Research, 39, 2017, s. 43-50, https://doi.org/10.1016/j.nutres.2017.02.006.
87. Gajęcka M., Rybarczyk L., Jakimiuk E., Zielonka Ł., Obremski K., Zwierzchowski W., Gajęcki M., *The effect of experimental long-term exposure to low-dose zearalenone on uterine histology in sexually immature gilts*, Experimental and Toxicologic Pathology, 64, 2012, s. 537-542, doi:10.1016/j.etp.2010.11.009.
88. Ren Z., Deng H., Deng Y., Liang Z., Deng J., Zuo Z., Hu Y., Shen L., Yu S., Cao S., *Combined effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative injury and apoptosis in porcine splenic lymphocytes in vitro*, Experimental and Toxicologic Pathology, 69, 2017, s. 612-617, http://dx.doi.org/10.1016/j.etp.2017.05.008.
89. Paiva-Martins F., Barbosa S., Silva M., Monteiro D., Pinheiro V., Mourão J.L., Fernandes J., Rocha S., Belo L., Santos-Silva A., *The effect of olive leaf supplementation on the constituents of blood and oxidative stability of red blood cells*, Journal of Functional Foods, 9, 2014, s. 271-279, doi:10.1016/j.jff.2014.04.027.
90. Tatay E., Espín S., García-Fernández A.J., Ruiz M.J., *Oxidative damage and disturbance of antioxidant capacity by zearalenone and its metabolites in human cells*, Toxicology in Vitro, 45, 2017, s. 334-339, http://dx.doi.org/10.1016/j.tiv.2017.04.026.
91. Jilani K., Lang F., *Ca(2+)-dependent suicidal erythrocyte death following zearalenone exposure*, Archives of Toxicology, 87, 2013, s. 1821-1828, DOI 10.1007/s00204-013-1037-1.
92. Gajęcka M., Przybylska-Gornowicz B., *The low doses effect of experimental zearalenone (ZEN) intoxication on the presence of Ca^{2+} in selected ovarian cells from pre-pubertal bitches*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 15(4), 2012, s. 711-720, DOI 10.2478/v10181-012-0108-1.
93. Qadri S.M., Bissinger R., Solh Z., Oldenborg P.-A., *Eryptosis in health and disease: A paradigm shift towards understanding the (patho)physiological implications of programmed cell death of erythrocytes*, Blood Reviews, 31(6), 2017, s. 349-361,

https://doi.org/10.1016/j.blre.2017.06.001.
94. Pyrshev K.A., Klymchenko A.S., Csúcs G., Demchenko A.P., *Apoptosis and eryptosis: Striking differences on biomembrane level*, Biochimica et Biophysica Acta – Biomembrane, 1860, 2018, s. 1362-1371, https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2018.03.019.
95. Lang E., Lang F., *Mechanisms and pathophysiological significance of eryptosis, the suicidal erythrocyte death*, Seminars in Cell and Developmental Biology, 39, 2015, s. 35-42, doi: 10.1016/j.semcdb.2015.01.009.
96. Chan W.Y., Lau P.M., Yeung K.W., Kong S.K., *The second generation tyrosine kinase inhibitor dasatinib induced eryptosis in human erythrocytes-An in vitro study*, Toxicology Letters, 295, 2018, s. 10-21, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2018.05.030.
97. Yorbik O., Mutlu C., Tanju I.A., Celik D., Ozcan O., *Mean platelet volume in children with attention deficit hyperactivity disorder,* Medical Hypotheses, 82, 2014, s. 341-345, http://dx.doi.org/10.1016/j.mehy.2014.01.001.
98. Meyer J., Lejmi E., Fontana P., Morel P., Gonelle-Gispert C., Bühler L., *A focus on the role of platelets in liver regeneration: Do platelet-endothelial cell interactions initiate the regenerative process?,* Journal of Hepatology, 63, 2015, s. 1263-1271, https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.07.002.
99. Dai Q., Zhang G., Lai Ch., Du Z., Chen L., Chen Q., Peng L., Wang Y., Yang H., Ye L., Yang X., Jiang Y., *Two cases of false platelet clumps flagged by the automated hematology analyzer Sysmex XE-2100*, Clinica Chimica Acta, 429, 2014, s. 152-156, http://dx.doi.org/10.1016/j.cca.2013.12.013.
100. Wysokiński A., Szczepocka E., *Platelet parameters (PLT, MPV, P-LCR) in patients with schizophrenia, unipolar depression and bipolar disorder,* Psychiatry Research, 237, 2016, s. 238-245, http://dx.doi.org/10.1016/j.psychres.2016.01.034.
101. Rai A., Das M., Tripathi A., *Occurrence and toxicity of a fusarium mycotoxin, zearalenone*, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2019, https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1655388.
102. Chen L., Giesy J.P., Xie P., *The dose makes the poison*, Science of the Total Environment, 621, 2018, s. 649-653, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2017.11.218.
103. Wang N., Wu W., Pan J., Long M., *Detoxification Strategies for Zearalenone Using Microorganisms: A Review*, Microorganisms, 7, 2019, s. 208, doi:10.3390/microorganisms7070208.
104. Cole T.J., Short K.L., Hooper S.B., *The science of steroids*, Seminars in Fetal & Neonatal Medicine, 24(3), 2019, s. 170-175, https://doi.org/10.1016/j.siny.2019.05.005.
105. Przybylska-Gornowicz B., Lewczuk B., Prusik M., Hanuszewska M., Petrusewicz-Kosińska M., Gajęcka M., Zielonka Ł., Gajęcki M., *The Effects of Deoxynivalenol and Zearalenone on the Pig Large Intestine. A Light and Electron Microscopy Study*, Toxins, 10, 2018, s. 148, doi:10.3390/toxins10040148.
106. Rivera H.M., Stincic T.L., *Estradiol and the control of feeding behavior*, Steroids, 133, 2018, s. 44-52, https://doi.org/10.1016/j.steroids.2017.11.011.
107. Jiang X., Lu N., Xue Y., Liu S., Lei H., Tu W., Lu Y., Xia D., *Crude fiber modulates the fecal microbiome and steroid hormones in pregnant Meishan sows*, General and Comparative Endocrinology, 2019, https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2019.04.006.
108. Jakimiuk E., Kuciel-Lisiecka G., Zwierzchowski W., Gajęcka M., Obremski K., Zielonka Ł., Skorska-Wyszyńska E., Gajęcki M., *Morphometric changes of the reproductive system in gilts during zearalenone mycotoxicosis*, Medycyna Weterynaryjna, 62, 2006, s. 99-102.
109. Goldstein I., Kim N.N., Clayton A.H., DeRogatis L.R., Giraldi A., Parish S.J., Pfaus J., Simon J.A., Kingsberg S.A., Meston C., Stahl S.M., Wallen K., Worsley R., *Hypoactive Sexual Desire Disorder: International Society for the Study of Women's Sexual Health (ISSWSH) Expert Consensus Panel Review*, Mayo Clinic Proceedings, 92(1), 2017, s. 114-128, http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.09.018.

110. Islam R.M., Bell R.J., Green S., Davis S.R., *Effects of testosterone therapy for women: a systematic review and meta-analysis protocol*, Systematic Reviews, 8, 2019, s. 19, doi: 10.1186/s13643-019-0941-8.
111. Kanakis G.A., Tsametis C.P., Goulis D.G., *Measuring testosterone in women and men*, Maturitas, 125, 2019, s. 41-44, https://doi.org/10.1016/j.maturitas.2019.04.203.
112. White S.F., Lee Y., Phan J.M., Moody S.N., Shirtcliff E.A., *Putting the flight in „fight-or-flight": Testosterone reactivity to skydiving is modulated by autonomic activation*, Biological Psychology, 143, 2019, s. 93-102, https://doi.org/10.1016/j.biopsycho.2019.02.012.
113. Bhasin S., Jasuja R., *Reproductive and Nonreproductive Actions of Testosterone. Encyclopedia of Endocrine Diseases (Second Edition)*, Print Book, ISBN 9780128121993, Academic Press. 2, 2019, 721-734, https://doi.org/10.1016/B978-0-12-801238-3.65412-0.
114. van Anders S.M., Steiger J., Goldey K.L., *Effects of gendered behavior on testosterone in women and men*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 112(45), 2015, s. 13805-13810, doi: 10.1073/pnas.1509591112.
115. Sun X., Jia Z., *Microbiome modulates intestinal homeostasis against inflammatory diseases*, Veterinary Immunology and Immunopathology, 205, 2018, s. 97-105, https://doi.org/10.1016/j.vetimm.2018.10.014.
116. Reddy K.E., Jeong J.Y., Song J., Lee Y., Lee H.J., Kim D.W., Jung H.Y., Kim K.H., Kim M., Oh Y.K., Lee S.D., Kim M., *Colon Microbiome of Pigs Fed Diet Contaminated with Commercial Purified Deoxynivalenol and Zearalenone*, Toxins, 10, 2018, s. 347, doi:10.3390/toxins10090347.
117. Shames B., *Anatomy and Physiology of the Duodenum*, Shackelford's Surgery of the Alimentary Tract, 2(1), 2019, s. 786-803, https://doi.org/10.1016/B978-0-323-40232-3.00068-6.
118. Liew W.P.P., Mohd-Redzwan S., *Mycotoxin: Its Impact on Gut Health and Microbiota*, Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, 8(60), 2018, s. 1-17, doi: 10.3389/fcimb.2018.00060.
119. Brisola M.C., Crecencio R.B., Bitner D.S., Frigo A., Rampazzo L., Stefani L.M., Faria G.A., *Escherichia coli used as a biomarker of antimicrobial resistance in pig farms of Southern Brazil*, Science of the Total Environment, 647, 2019, s. 362-368, https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2018.07.438.
120. Zheng W., Ji X., Zhang Q., Yao W., *Intestinal Microbiota Ecological Response to Oral Administrations of Hydrogen-RichWater and Lactulose in Female Piglets Fed a Fusarium Toxin-Contaminated Diet*, Toxins 10, 2018, s. 246, doi:10.3390/toxins10060246.
121. Liao S.F., Nyachoti M., *Using probiotics to improve swine gut health and nutrient utilization*, Animal Nutrition, 3(4), 2017, s. 331-343, https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.06.007.
122. Bajagai Y.S., Klieve A.V., Dart P.J., Bryden W.L., *Probiotics in animal nutrition e production, impact and regulation. In: Makkar HPS, editor*, FAO animal production and health paper No. 179. Rome, Italy: Food and Agriculture Organization of the United Nation, 2016.
123. Panasiuk Ł., Piątkowska M., Pietruszka K., Jedziniak P., Posyniak A., *Modified mycotoxins – a hidden threats beyond official control* Życie Weterynaryjne, 93(8), 2018, s. 543-547.
124. Youssef I.M.I., Kamphues J., *Fermentation of lignocellulose ingredients in vivo and in vitro via using fecal and caecal inoculums of monogastric animals (swine/turkeys),* Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences, 7, 2018, s. 407-413, http://dx.doi.org/10.1016/j.bjbas.2017.05.006.
125. Regassa A., Nyachotim C.M., *Application of resistant starch in swine and poultry diets with particular reference to gut health and function*, Animal Nutrition, 4(3), 2018, s. 305-310, https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.001.

126. Metzler-Zebeli B.U., Trevisi P., Prates J.A.M., Tanghe S., Bosi P., Canibe N., Montagne L., Freire J., Zebeli Q., *Assessing the effect of dietary inulin supplementation on gastrointestinal fermentation, digestibility and growth in pigs: A meta-analysis*, Animal Feed Science and Technology, 233, 2017, s. 120-132, https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2017.05.010.
127. Davis M.F., Pisanic N., Rhodes S.M., Brown A., Keller H., Nadimpalli M., Christ A., Ludwig S., Ordak C., Spicer K., Love D.C., Larsen J., Wright A., Blacklin S., Flowers B., Stewart J., Sexton K.G., Rule A.M., Heaney C.D., *Occurrence of Staphylococcus aureus in swine and swine workplace environments on industrial and antibiotic-free hog operations in North Carolina, USA: A One Health pilot study*, Environmental Research, 163, 2018, s. 88-96, https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.12.010.
128. Yu W., Kim H.K., Rauch S., Schneewind O., Missiakas D., *Pathogenic conversion of coagulase-negative staphylococci*, Microbes and Infection, 19(2), 2017, s. 101-109, https://doi.org/10.1016/j.micinf.2016.12.002.
129. Drew M.D., Van Kessel A.G., Estrada A.E., Ekpe E.D., Zijlstra R.T., *Effect of dietary cereal on intestinal bacterial populations in weaned pigs*, Canadian Journal of Animal Science, 82, 2002, s. 607-609.
130. Saha S., Samanta G.P., *Dynamics of an epidemic model with impact of toxins*, Physica A, 527, 2019, s. 121-152, https://doi.org/10.1016/j.physa.2019.121152.
131. Dowarah R., Verma A.K., Agarwal N., Patel B.H.M., Singh P., *Effect of swine based probiotic on performance, diarrhoea scores, intestinal microbiota and gut health of grower-finisher crossbred pigs*, Livestock Science, 195, 2017, s. 74-79, http://dx.doi.org/10.1016/j.livsci.2016.11.006.
132. Baker A.A., Davis E., Rehberger T., Rosener D., *Prevalence and Diversity of Toxigenic Clostridium perfringens and Clostridium difficile among Swine Herds in the Midwest*, Applied and Environmental Microbiology, 76, 2010, s. 2961-2967, doi:10.1128/AEM.02459-09.
133. Krutova M., Zouharova M., Matejkova J., Tkadlec J., Krejčí J., Faldyna M., Nyc O., Bernardy J., *The emergence of Clostridium difficile PCR ribotype 078 in piglets in the Czech Republic clusters with Clostridium difficile PCR ribotype 078 isolates from Germany, Japan and Taiwan*, International Journal of Medical Microbiology, 308(7), 2018, s. 770-775, https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2018.05.006.
134. Schoenfelder S.M.K., Dong Y., Feßler A.T., Schwarz S., Schoen C., Köck R., Ziebuhr W., *Antibiotic resistance profiles of coagulase-negative staphylococci in livestock environments*, Veterinary Microbiology, 200, 2017, s. 79-87, https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2016.04.019.
135. Lupescu A., Bissinger R., Jilani K., Lang F., *In vitro induction of erythrocyte phosphatidyloserine translocation by the natural Naphthoquinone Shikonin*, Toxins, 6, 2014, s. 1559-1574, https://doi.org/10.3390/toxins6051559.
136. Pluske J.R., Turpin D.L., Kim J.C., *Gastrointestinal tract (gut) health in the young pig*, Animal Nutrition, 4, 2018, s. 187-196, https://doi.org/10.1016/j.aninu.2017.12.004.
137. Putignani L., Dallapiccola B., *Foodomics as part of the host-microbiota-exposome interplay*, Journal of Proteomics, 147, 2016, s. 3-20, http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2016.04.033.
138. Otašević S., Momčilović S., Petrović M., Radulović O., Stojanović N.M., Arsić-Arsenijević V., *The dietary modification and treatment of intestinal Candida overgrowth – a pilot study*, Journal de Mycologie Médicale, 28, 2018, s. 623-627, https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2018.08.002.
139. Jarolim K., Wolters K., Woelflingseder L., Pahlke G., Beisl J., Puntscher H., Braun D., Sulyok M., Warth B., Marko D., *The secondary Fusarium metabolite aurofusarin induces oxidative stress, cytotoxicity and genotoxicity in human colon cells*, Toxicology Letters, 284, 2018, s. 170-183, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2017.12.008.
140. Kuciel-Lisieska G., Obremski K., Stelmachów J., Gajęcka M., Zielonka Ł., Jakimiuk E.,

Gajęcki M., *Presence of zearalenone in blood plasma in women with neoplastic lesions in the mammary gland*, Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 52, 2008, s. 671-674.
141. Lathe R., Kotelevtsev Y., Mason J.I., *Steroid promiscuity: Diversity of enzyme action*, The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 151, 2015, s. 1-2, https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2015.01.008.
142. Salah-Abbčs J.B., Abbčs S., Ouanes Z., Abdel-Wahhab M.A., Bacha H., Oueslati R., *Isothiocyanate from the Tunisian radish (Raphanus sativus) prevents genotoxicity of Zearalenone in vivo and in vitro*, Mutation Research, 677, 2009, s. 59-65, doi:10.1016/j.mrgentox.2009.05.017.
143. Jakimiuk E., Gajęcka M., Jana B., Brzuzan P., Zielonka Ł., Skorska-Wyszyńska E., Gajęcki M., *Factors determining sensitivity of prepubertal gilts to hormonal influence of zearalenone*, Polish Journal of Veterinary Sciences, 12(1), 2009, s. 149-158.
144. Nowak A., Śliżewska K., Gajęcka M., Piotrowska M., Żakowska Z., Zielonka Ł., Gajęcki M., *The genotoxicity of caecal water from gilts following experimentally induced Fusarium mycotoxicosis*, Veterinarni Medicina, 60(3), 2015, s. 133-140, doi: 10.17221/8058-VETMED.
145. Pfeiffer E., Wefers D., Hildebrand A.A., Fleck S.C., Metzler M., *Catechol metabolites of the mycotoxin zearalenone are poor substrates but potent inhibitors of catechol-O-methyltransferase*, Mycotoxin Research, 29(3), 2013, s. 177-183, doi: 10.1007/s12550-013-0165-z.
146. Speranda M., Liker B., Speranda T., Seric V., Antunovic Z., Grabarevic Z., Sencic D., Grguric D., Steiner Z., *Haematological and biochemical parameters of weaned piglets fed on fodder mixture contaminated by zearalenone with addition of clinoptilolite*, Acta Veterinaria-Beograd, 56, 2006, s. 121-136, DOI: 10.2298/AVB0603121S.
147. De Boevre M., Graniczkowska K., De Saeger S., *Metabolism of modified mycotoxins studied through in vitro and in vivo models: An overview*, Toxicology Letters, 233, 2015, s. 24-28, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.12.011.
148. Taranu I., Braicu C., Marin D.E., Pistol G.C., Motiu M., Balacescu L., Neagoe I.B., Burlacu R., *Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression*, Toxicology Letters, 232, 2015, s. 310-325, https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2014.10.022.

Komplementarność badań niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowej na wybrane wskaźniki zdrowotne niedojrzałych płciowo loszek

Streszczenie

Świadomość o wpływie bardzo niskich dawek zearalenonu i jego metabolitów na organizmy ssaków *in vivo* jest mała. Odpowiedź organizmu narażonych niedojrzałych płciowo loszek przebiega odmiennie. Jednym z pierwszych biomarkerów, mógłby być β-ZEL, który przyczynia się do nieznacznego zwiększania przyrostów masy ciała, ale równocześnie spowalnia dojrzewanie płciowe prepubertal gilts i zmienia stopień przyswajalności substancji odżywczych. Początkowo ma miejsce bardzo niski poziom ZEN i brak metabolitów w surowicy krwi (szczególnie przy dawce MABEL), co potwierdza duże fizjologiczne zapotrzebowanie organizmu loszek na egzogenne substancje estrogeno-podobne. Wyższe dawki powodują występowanie tzw. wolnego ZEN, który spełnia inną, nie zawsze pozytywną rolę. Proporcjonalnie do dawki ZEN, wzrasta poziom E_2 i „wolnego ZEN". Duet ten wpływa supresyjnie na wartości stężeń P_4 i T. Równocześnie, z wyników profilu metabolicznego wynika, że ma miejsce wzmożona utrata energii i białka, co sugeruje o efektywniejszym wykorzystaniu paszy lub/i dużym stopniu zaangażowania w procesy biotransformacyjno-detoksykacyjne. Towarzyszy temu, przesunięcie ilościowe mikrobiomu jelitowego do części dystalnej jelit. Ponadto, ZEN jest genotoksyczny, z wyjątkiem dawki MABEL, gdzie genotoksyczność jest na tym samym poziomie jak u niedojrzałych płciowo loszek nienarażanych ZEN. Niektóre wyniki wybranych badań laboratoryjnych, mogą być sugerowane jako biomarkery niskodawkowej długotrwałej mikotoksykozy zearalenonowej u niedojrzałych płciowo loszek, w ramach precyzyjnej medycyny weterynaryjnej.

Słowa kluczowe: zearalenon i jego metabolity, profil metaboliczny, hormony sterydowe, mikrobiom jelitowy, genotoksyczność, masa ciała, niedojrzałe płciowo loszki

A complementary analysis of the effects of low-dose zearalenone mycotoxicosis on selected health status indicators in pre-pubertal gilts

Abstract

Awareness of the effect of very low doses of zearalenone (ZEN) and its metabolites on mammals in vivo is low. Pre-pubertal gilts respond differently to high and low doses of the above mycotoxins. Beta-zearalenol (β-ZEL) could be one of the first biomarkers of ZEN mycotoxicosis. This compound contributes to a minor increase in weight gain, but it also slows down sexual maturation in pre-pubertal gilts, and modifies nutrient availability. Very low levels of ZEN and the absence of its metabolites in the blood serum, observed in the first stage of exposure (in particular at the MABEL dose), confirm that pre-pubertal gilts have a high physiological demand for exogenous estrogen-like compounds. Higher doses lead to the occurrence of the so called „free ZEN" which plays a different, not always positive, role. The levels of E2 and „free ZEN" increase proportionally to the ZEN dose. These two compounds suppress the concentrations of P4 and T. An analysis of the metabolic profile points to increased energy and protein losses, which suggests that feed is converted more efficiently and/or that biotransformation and detoxification processes are enhanced. These processes are accompanied by a quantitative shift of the gut microbiota to the distal intestinal segment. Moreover, ZEN exerts genotoxic effects, except for the MABEL dose whose genotoxicity is at the level observed in pre-pubertal gilts not exposed to ZEN. In veterinary precision medicine, the results of selected laboratory tests could be used as biomarkers of long-term and low-dose ZEN mycotoxicosis in pre-pubertal gilts.

Keywords: zearalenone and its metabolites, metabolic profile, steroid hormones, gut microbiome, genotoxicity, body weight, pre-pubertal gilts

Piotr Wójcik[1]

Wykorzystanie czujników ruchu w monitoringu zachowań behawioralnych bydła mlecznego

1. Wstęp

Stosowany obecnie w wielu obiektach hodowlanych monitoring zwierząt z jednej strony jest bardzo precyzyjną metodą pomiaru zachowań behawioralnych, z drugiej niezwykle czasochłonny i trudny do przeprowadzenia [23]. W konsekwencji w ostatnich latach wzrasta zainteresowanie urządzeniami do mierzenia aktywności dobowej bydła mocowanymi bezpośrednio na osobniku. Ocena aktywności zwierząt przy pomocy pedometrów ewoluowała od chwili, kiedy po raz pierwszy została opisana [7]. Pierwszym celem, dla którego zbierano dane dotyczące aktywności była możliwość wykrycia rui i przez to precyzyjniejsze wyznaczenie czasu inseminacji [16, 24]. Ponieważ hormonów płciowych nie oznacza się rutynowo w żadnym gospodarstwie, inne formy badawcze były bardzo oczekiwane, stad taka popularność pedometrów [16]. Badania Granta [8] wykazały, że krowy spędzają na przemieszczaniu się i staniu od 8 do 12% czasu, czynności związane z dojem zajmują od 11 do 15% swojego czasu, na pobieranie pokarmu i wody od 20 do 25% doby oraz od 40 do 50% na wypoczynek i przeżuwanie. Potwierdzają to badania wielu innych naukowców [5, 6, 9, 12, 23, 27]. Wskazano rozkład czasu aktywności bydła, wskazując obszar wzmożonej aktywności od godziny 600 do 800 a podwyższony od godziny 1700, po której następuje spadek aktywności aż do godziny 2000. Ponowna aktywność wzrasta w okolicach godziny 2100 [16]. Badania krajowe także wskazują, że zasadniczo krowa w oborze poświęca od 4 do 6 godzin na pobieranie paszy. Czynności te są cykliczne a jeden taki okres trwa od pół do godziny w przypadku pobierania paszy i trzy minuty na picie [18]. W przeciągu doby krowa odpoczywa od 10 do 14 godzin, a najniższą aktywność wykazuje w godzinach od północy do 600 i w godzinach od 1500 do 1800 [31]. Prezentowane zachowania behawioralne często jednak odbiegają od przyjętego wzorca gatunkowego, a nawet rasowego w wyniku różnych sytuacji panujących w obiekcie w tym termicznych. Zmiany mogą skutkować zmniejszeniem czasu odpoczynku zwierząt co prowadzi do zakłóceń w krążeniu krwi, pogorszenia trawienia oraz przeciążenia kończyn [30]. Guliński i wsp. [9] stwierdzają, że wydłużenie czasu, które krowy spędzają leżąc powoduje zmniejszenie częstotliwości występowania kulawizn. Pozwala to również na zwiększenie wydajności mleczne, poziomu dobrostanu oraz zmniejszenie kosztów opieki weterynaryjnej. Aktywność ruchową zwierzęcia determinuje wiele czynników: liczba laktacji, wiek zwierzęcia [20], poziom produkcji mlecznej, [32] poziom ruchliwość [25]. Krowy są zwierzętami społecznymi [1, 23]. Przebywanie w stadzie jest korzystne pod wieloma względami: zwierzęta mogą łatwiej się bronić, wcześniej dostrzegać zagrożenie, młodsze osobniki uczą się strategii przetrwania jak również korzystają z wiedzy bardziej doświadczonych osobników na temat lokalizacji pożywienia i wody [1, 23]. Zwierzęta, które opuszczają grupę, czują się zagrożone [1]. Stają się bardziej lękliwe i gorzej tolerują stres [23]. Najbardziej

[1] piotr.wojcik@izoo.krakow.pl, Zakład Hodowli Bydła, Instytut Zootechniki PIB.

naturalnym środowiskiem bytowania krów jest oprócz utrzymania pastwiskowego/ głównie bydło mięsne/wolnostanowiskowy system utrzymania [3]. System ten jednak nie powstał dla dobra zwierząt, lecz intensywnego chowu zwierząt, stworzony, by maksymalizować gęstość obsady, łatwo zarządzać stadem i minimalizować straty. Intensywne systemy produkcji zapewniają więc krowom odpowiednią ilość czasu na odpoczynek, ale nie zawsze zapewniają dogodne miejsce do odpoczynku a zasadą jest, że liczba stanowisk jest mniejsza od liczby zwierząt przebywających w kojcu [10]. Dodatkowym czynnikiem ograniczającym dobrostan jest powierzchnia kojca. W konsekwencji powoduje to wzrost częstotliwości zachowań antagonistycznych zmierzających do zapewnienia osobnikowi dostępu do zasobów (wody, paszy, miejsca odpoczynku). Zwiększona częstotliwość ich występowania może oznacza wystąpienie zaburzeń w relacjach pomiędzy osobnikami, co może wpływać negatywnie na stado poprzez wypaczenie zachowań pokarmowych i społecznych [2]. Zmianie może ulec rytm dobowy [23], jak również częstotliwość zachowań agresywnych [13, 27]. Zbyt duża obsada, może indukować choroby oraz niekorzystne zmiany parametrów fizjologicznych [23]. W okresie globalnego ocieplenia dochodzi jeszcze czynnik stresu cieplnego determinującego zachowanie się zwierząt [4]. Overton'a i wsp. [21] w badaniach stwierdzili, że przy najwyższej temperaturze otoczenia liczba odpoczywających zwierząt w pozycji leżącej była najmniejsza. Tłumaczy to zjawisko Igono i wsp. [11] zwiększoną powierzchnią krowy oddającej ciepło. W konsekwencji krowy spędzają więcej czasu w pozycji leżącej w trakcie zimy. Częstotliwość pobierania wody, defekacji i mikcji zwiększała się w okresie od zimy do lata [22]. Aktywność ruchowa zaobserwowana w okresie zimowym jest istotnie mniejsza niż w okresie letnim [15]. Biorąc pod uwagę tak złożony problem dobrostanu i behawioru zwierząt dochodzi się do wniosku, że tylko autonomiczne systemy pomiaru aktywności dobowej, mogące „uczyć się" indywidualnych zachowań bydła, mogą rzeczywiście informować o dobrostanie, zdrowotności i płodności osobników.

2. Wyniki badań

Badania prowadzono w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzelowie, woj. Podkarpackie na grupie krów rasy Polskiej Holsztyńsko-Fryzyjskiej (PHF). Utworzono trzy grupy zwierząt doświadczalnych o liczebności nie niższej niż 25 sztuk, którym zamocowano pedometry na nodze tylnej firmy Afikim. Grupy I, II, III powstały na zasadzie analogów pod względem ilości krów w danej laktacji w podziale zaprezentowanym poniżej:

Grupa I – krowy utrzymywane w normatywnej ilości w sektorze bez wybiegu i podlegające okresowemu zagęszczaniu /tabela 1/ – 25 sztuk, przy powierzchni początkowej 3,80 m^2/szt.

Grupa II – krowy utrzymywane w normatywnej ilości w sektorze z wybiegiem i podlegające okresowemu zagęszczaniu /tabela 1/ – 25 sztuk, przy powierzchni początkowej 7,74 m^2/szt.

Grupa III – krowy utrzymywane w normatywnej ilości w sektorze z wybiegiem przeznaczone do rozgęszczenia – 31 sztuk, przy powierzchni początkowej 6,24 m^2/szt.

W celu prześledzenia behawioru badanych zwierząt w oparciu o ich aktywność wydzielając okresy badawcze (tab. 1):

Tabela 1. Zmiany obsady zwierząt i powierzchnia bytowa w poszczególnych grupach badawczych w zależności od okresu doświadczalnego

Okres badawczy	Grupa badawcza		
	I	II	III
	szt m^2/szt	szt m^2/szt	szt m^2/szt
Okres porównawczy Okres doświadczalny I Okres doświadczalny II	25 3,80 30 3,16 35 2,71	25 7,74 30 6,45 35 5,35	31 6,24 21 9,21 11 17,6

Wyniki badań zostały opracowane statystycznie w oparciu o program statystyczny SAS uwzględniający badane parametry i czynniki warunkujące uzyskane wyniki. Ze względu na grupy o różnej liczebności zwierząt w analizach statystycznych zastosowano procedurę LSM w pakiecie statystycznym SAS v.93. Analiza wyników aktywności zwierząt należących do I grupy doświadczalnej wykazała, że zagęszczenie zwierząt i zmniejszenie powierzchni z 3,80 do 3,16 m^2/szt. nie wykazała znaczących zmian aktywności zwierząt. Nieznaczne skróceniu uległa długość pojedynczego odpoczynku (o 4 min), która wraz ze zwiększoną częstotliwością odpoczynku z 10,64 do 12,45 razy spowodowała dłuższy łączny czas odpoczynku o 41,75 min. Różnice pomiędzy badanymi grupami w obrębie cechy zostały statystycznie potwierdzone na poziomie $P \leq 0,01$. Także Telezhenko i wsp. [28] badając wpływ zagęszczenia, jak również wielkości kojca na aktywność zwierząt, zauważyli, że zarówno w małym jak i dużym kojcu przy zwiększeniu gęstości obsady odnotowano zwiększenie częstotliwości odpoczynku przy jednoczesnym skróceniu jego czasu trwania. W II okresie doświadczalnym uległ on znacznemu skróceniu i uległ obniżeniu do 423,03 min, pomimo tego, że zwierzęta były mniej aktywne (122,05 kroków/godz.). Odpoczynki stały się, rzadsze, ale równocześnie dłuższe (59,91 min), co mogło być spowodowane problemem ze znalezieniem miejsca do odpoczynku. Wyniki badań Krawczela i wsp. [14] są zbieżne z otrzymanymi w doświadczeniu. Przy wzroście gęstości obsady ze 100 do 142% częstotliwość odpoczynków uległa redukcji z 11,7 do 10,7, a jednocześnie długość pojedynczego odpoczynku wzrosła z 67 min do 69,3 min. Analiza aktywności krów badanej grupy II doświadczalnej wykazuje wyraźne zmiany aktywności dobowej krów. W II okresie doświadczenia odnotowano spadek aktywności zwierząt ($P \leq 0,01$). Częstotliwość odpoczynku, jak również łączny czas odpoczynku uległy zmniejszeniu w trakcie II okresu doświadczalnego przyjmując wartości 7,36 i odpowiednio 421,33 min. Największa częstotliwość odpoczynku (11,15) przy porównywalnych długościach pojedynczego odpoczynku wykazywały zwierzęta z I okresu doświadczalnego, przez to osiągnęły najwyższy wynik łącznego czasu odpoczynku (674,55 min). Różnice pomiędzy badanymi grupami zostały statystycznie potwierdzone w obrębie wszystkich badanych cech. Aktywność krów z grupy III podlegała statystycznie istotnym wahaniom ($P \leq 0,01$). Obserwowane zmiany były jednak najmniejsze w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych (I-II) z racji najmniejszej obsady zwierząt na metr powierzchni. Średni czas odpoczynku badanych krów jak w przypadku pozostałych grup badawczych (I-II) był najkrótszy w przypadku drugiego okresu doświadczalnego (478,59 min) pomimo najwyższego spadku zagęszczenie względem innych grup. Wang i wsp. [2016] zmniejszając obsadę zwierząt do 82% zauważali wydłużenie okresu średniego czasu odpoczynku z 11,79

do 12,19 godzin na dobę. W doświadczeniu nie zaobserwowano powyższych zmian. Należy przypuszczać, że uzyskane wyniki były efektem innych niebadanych czynników, jak panujące warunki klimatyczne [19]. Długość pojedynczego odpoczynku ulegała niewielkim zmianom z tendencją do spadku w kolejnych okresach ($P \leq 0,01$).

W kolejnych badaniach behawioralnych prowadzonych w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Kołbaczu, woj. Zachodniopomorskie porównano krowy mieszańce /phf x sim/ z krowami czystorasowymi mlecznymi phf. W tym celu przeanalizowano podstawowe mierniki aktywności dobowej zwierząt kształtujące ich behawior w grupach liczących po 20 sztuk, które były utrzymywane w tych samych warunkach środowiskowo-żywieniowych. Analizie poddano średnią aktywność godzinową krów w I, II i III laktacji oraz w okresach 100, 200 i 300 dni trwania poszczególnych laktacji. Na podstawie otrzymanych wyników stwierdzono w obrębie laktacji jak i poszczególnych okresów laktacyjnych wyższą aktywność bydła rasy PHF. Różnice w obrębie danej laktacji, kształtowały się od 3 do 21 kroków/godz. na korzyść grupy PHF. W analizowanych okresach laktacyjnych najwyższą aktywność bydło mieszańcowe oraz PHF przejawiało w ostatnim okresie laktacji – pow. 300 dnia na poziomie odpowiednio 103/h i 111/h kroków. Najniższą aktywność zaobserwowano u obu grup w 100 dniach I, II i III laktacji. Średni dobowy czas spoczynku na jedno leżenie w obu grupach był podobny /77-78 min/, łączny czas spoczynku nieznacznie wyższy u mieszańców – 473 min/dobę.

Analizy behawioralne przy zastosowaniu pedometrów dotyczyły także wpływu warunków środowiskowych w okresie wypasu bydła. Badaniach prowadzonych w Zakładzie Doświadczalnym Instytutu Zootechniki PIB w Chorzelowie woj. Podkarpackie na grupie krów rasy Polskiej Holsztyńsko-Fryzyjskiej (PHF). Badania prowadzono przez cały okres sezonu pastwiskowego od 9.00-17.00. Analizowano warunki atmosferyczne: temperatura, siła wiatru, opady deszczu. Odczyt dokonywano dwa razy dziennie podczas doju. Na podstawie średnich wartości badanych cech stwierdzono, że warunki atmosferyczne panujące na pastwisku determinowały aktywność dobową zwierząt. Przy temperaturze powietrza do 10°C średnia aktywność godzinowa wynosiła 141 kroków. Wzrost o kolejne 10°C powoduje wzrost aktywności o 25% oraz częstotliwości odpoczynku o 6%, przy skróconym średnim łącznym czasie spoczynku o 9% do poziomu 602 minut na dobę. Wzrost prędkości wiatru z 5 do 15 m/s skutkował zmniejszeniem aktywności krów o 18%, wzrostem częstotliwości odpoczynków o 19% i średniego czasu spoczynku o 10% oraz łącznego czasu spoczynku w dobie o 60 minut. Przy opadach deszczu do 50 mm aktywność bydła mlecznego była na poziomie 170 kroków na godzinę a dalszy wzrost opadów powodował spadek aktywności do poziomu 151 kroków. Częstotliwość odpoczynku nie ulegała zmianie a jedynie wydłużył się średni czas spoczynku. Tym samym łączny czas spoczynku wzrósł o 6%, co stanowi 38 minut na dobę. Badania wykazały, że nadmierny wzrost aktywności zwierząt z 100 kroków na godzinę do ponad 300 skutkuje nie tylko zmniejszeniem się łącznego czasu odpoczynku, ale także spadkiem wydajności mlecznej badanych krów.

3. Podsumowanie

Podsumowując, należy stwierdzić, że obecnie na fermach istnieje możliwość bardzo dokładnego monitoringu zachowań behawioralnych zwierząt w tym ich aktywności poprzez zastosowanie nowoczesnych pedometrów. Działania takie pozwalają na odpowiednie reagowanie na niepokojące zachowania wśród zwierząt, czy zbyt silne oddziaływanie środowiska hodowlanego. Szybka analiza nieprawidłowości i przeciwdziałanie umożliwia optymalizację produkcji, poprawę dobrostanu a tym samym zwiększenie efektywności produkcji. Obecnie systemy te są oparte o samoistnie uczenie się tym samym bardzo precyzyjnie mogą sygnalizować, gdy następują odstępstwo od przyjętych założeń lub ekspresji samych zwierząt na niekorzystne warunki środowiskowo-żywieniowe.

Literatura:

1. Abramowicz P., Brzozowski P., Gołebiewski M., *Praktyczne aspekty społecznych zachowań bydła*, Medycyna weterynaryjna, 2014, 70, 02, s. 90-93.
2. Battini M., Vieira A., Barbieri S., Ajuda I., Stilwell G., Mattiello S., *Invited review: Animal-based indicators for on-farm welfare assessment for dairy goats*, Journal Dairy Science, 97, 2014, s. 6625-6648.
3. Boćkowski M., Gawroński M., *Wskaźniki oceny obór z różnymi systemami utrzymana bydła mlecznego*, Polskie Towarzystwo Inżynierii Rolniczej, 2013, 3 (146), 2, s. 31-39.
4. Cook N.B., Mentink R.L., Bennett T.B., Burgi K.J., *The Effect of Heat Stress and Lameness on Time Budgets of Lactating Dairy Cows*, Journal Dairy Science, 2007, 90, s. 1674-1682.
5. Czerniawska-Piątkowska E., Szewczuk M., Snopkowska M., *Porównanie użytkowości mlecznej krów rasy Polskiej Holsztyńko-Fryzyjskiej w różnych systemach utrzymania*, Zeszyty Naukowe Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, 2008, 566, s. 25-34.
6. Devries T.J., von Kerserlingk M.A.G., *Time of feed delivery affects the feeding and lying patterns of dairy cows*, Journal Dairy Science, 2005, 88 (2), s. 625-631.
7. Farris E.J., *Activity of dairy cows during estrus*, Journal American Veterinary Medical Association, 1954, 125, s. 117-120.
8. Grant R., *Taking advantage of natural behavior improves dairy cow performance*, Proc. Western Dairy Management Conf., Reno, NV, 2007, s. 225-236.
9. Guliński P., Salamończyk E., Młynek K., *Czy odpoczynek bydła jest priorytetowym typem ich zachowania?,* Bydło, 2014, 11, s. 52-55.
10. Haley D.B., Rushen J., de Passillé, *Behavioural indicators of cow comfort: activity and resting behaviour of dairy cows in two types of housing*, Canadian Journal of Animal Science, 2000, 80 (2), s. 257-263,
11. Igono M.O., Johnson H.D., Steevens B.J., Krause G.F., Shanklin M.D., *Physiological, productive, and economic benefits of shade, spray, and fan system versus shade for Holstein cows during summer heat*, Journal Dairy Science, 1987, 70, s. 1069-1079.
12. Kaczor A., Paraponiak P., Malinowski E., Olszewski A., *Wpływ stosowania wentytorów sufitowych na prędkość ruchu powietrza w oborach i zachowanie się krów*, Roczniki Naukowe Zootechniki, 2014, 41, 2, s. 153-163.
13. Keyserlingk M.A.G., Rushen J., de Passillé A.M., Weary D.M., *Invited review: The welfare of dairy cattle – Key concepts and the role of science*, Journal Dairy Science, 2009, 92, s. 4101-4111.
14. Krawczel P.D., Klaiber L.B., Butzler R.E., Klaiber L.M., Dann H.M., Mooney C.S., Grant R.J., *Short-term increases in stocking density affect the lying and social behavior, but not the productivity, of lactating Holstein dairy cows*, Journal Dairy Science, 2012, 95, s. 4298-4308.
15. López-Gatius F., Santolaria P., Mundet I., Yániz J.L., *Walking activity at estrus and subsequent fertility in dairy cows*, Journal Dairy Science, 2005, 63 (5), s. 1419-1429.

16. Løvendahl P., Chaqunda M.G., *On the use of physical activity monitoring for estrus detection in dairy cows*, Journal Dairy Science, 2010, 93 (1), s. 249-259.
17. Maatje K., Loeffler S.H., Engel B., *Predicting optimal time of insemination in cows that show visual signs of estrus by estimating onset of estrus with pedometers*, Journal Dairy Science, 1997, 80, s. 1098-1105.
18. Mróz P., Wójcik P., Cwynar M., *Production parameters of PHF cows depending on varying housing conditions during lactation*, Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis, Agricultura. Alimentaria. Piscaria et Zootechnica, 2017, 336(43), 3, s. 83-102.
19. Mróz P., Wójcik P., Pankowski M., *Daily activity of polish Holstein-Friesian cows depending on variable housing conditions during lactation*, Folia Pomeranae Universitatis Technologiae Stetinensis, Agricultura. Alimentaria. Piscaria et Zootechnica, 2017, 338, s. (44), 4, 119-130.
20. O'Driscoll K.K., Schutz M.M., Lossie A.C., Eicher S.D., *The effect of floor surface on dairy cow immune function and locomotion score*, Journal Dairy Science, 2009, 9, s. 42494261.
21. Overton M.V., Sischo W.M., Temple G.D., Moore D.A., *Using time-lapse video photography to assess dairy cattle lying behawior in a free-stall barn*, Journal Dairy Science, 2002, 85(9), s. 2407-2413.
22. Perera K.S., Gwazdauskas F., Pearson R.E., Brumback Jr.T.B., *Effect of Season and Stage of Lactation on Performance of Holsteins*, Journal Dairy Science, 1986, 69 (1), s. 228236.
23. Reinholz-Trojan A., *Znaczenie wiedzy o zachowaniu zwierząt w kontekście dobrostanu na przykładzie bydła domowego Bos taurus taurus*, W Zachowanie się zwierząt. Przegląd wybranych zagadnie z zakresu psychologii porównawczej, Vizja Press, 2007, s. 132-147.
24. Roelofs J.B., van Eerdenburg F.J.C.M., Soede N.M., Kemp B., *Pedometer readings for estrous detection and as a predictor for time of ovulation in dairy cattle*, Theriogenology, 2005, 64, s. 1690-1703.
25. Reader J.D., Green M.J. Kaler J., Mason S.A., Green L.E., *Effect of mobility score on milk yield and activity in dairy cattle*, Journal of Dairy Science, 2011, 94 (10), s. 5045-5052.
26. Rutten C.J., Velthuis A.G.J., Steeneveld W., Hogeveen H., I*nvited review: Sensors to suport healt management on dairy farms*, Journal Dairy Science, 2013, 96, s. 1928-1952.
27. Solan M., Jóźwik M., *Wpływ mikroklimatu oraz systemu utrzymania na dobrostan krów mlecznych*, Wiadomości Zootechniczne, 2009, 1, s. 25-29.
28. Telezhenko E., von Keyserling M.A.G., Talebi A., Weary D.M., *Effect of pen size, group size, and stocking density on activity in freestall-housed dairy cows*, Journal of Dairy Science, 2012, 95, s. 3064-3069.
29. Wang F.X., Shao D.F., Li S.L., Wang Y.J., Azarfar A., Cao Z.J., *Effects of stocking density on behavior, productivity, and comfort indices of lactating dairy cows*, Journal Dairy Science, 2016, 99, s. 3709-3717.
30. Wójcik P., *O czym mówi aktywność ruchowa krów mlecznych?,* Hodowca Bydła, 2010, 11, s. 29-32.
31. Wójcik P., Olszewski A., *Use of pedometers to analyse 24-hour activity and fertility of limousin cows*, Folia Pomeranea Universitatis Technologiae Stetinensis, Agricultura Alimentaria Piscaria, Zootechnica, 2015, 322 (36) 4, s. 119-124.
32. Ya´niza J. L., Santolariaa P., Giribetb A., Lo´pez-Gatius F., *Factors affecting walking activity at estrus during postpartum period and subsequent fertility in dairy cows*, Theriogenology, 2006, 66, s. 1943-1950.

Wykorzystanie czujników ruchu w monitoringu zachowań behawioralnych bydła mlecznego

Streszczenie

Celem pracy było zbadanie wpływu zmiennych warunków utrzymania na parametry produkcyjne krów polskich holszytyńsko-fryzyjskich /phf/. Czynnikami różnicującymi były dostęp do wybiegów oraz powierzchnia przypadająca na jedno zwierzę. Analiza wyników aktywności zwierząt należących do I grupy doświadczalnej wykazała, że zagęszczenie zwierząt i zmniejszenie powierzchni nie wykazała znaczących zmian aktywności zwierząt. W II okresie doświadczenia odnotowano spadek aktywności zwierząt ($P \leq 0,01$). Częstotliwość odpoczynku, jak również łączny czas odpoczynku uległy zmniejszeniu. Aktywność krów z grupy III podlegała statystycznie istotnym wahaniom ($P \leq 0,01$). Obserwowane zmiany były jednak najmniejsze w porównaniu do pozostałych grup doświadczalnych z racji najmniejszej obsady zwierząt na metr powierzchni. W badaniach behawioralnych porównano krowy mieszańce/phf x sim/ z krowami czystorasowymi mlecznymi phf. Stwierdzono w obrębie laktacji, jak i poszczególnych okresów laktacyjnych wyższą aktywność bydła rasy phf. Najwyższą aktywność bydło mieszańcowe oraz phf prezentowało w ostatnim okresie laktacji – pow. 300 dnia. Najniższą aktywność zaobserwowano u obu grup w 100 dniach I, II i III laktacji. Stwierdzono, że warunki atmosferyczne panujące na pastwisku determinowały aktywność dobową zwierząt. Wzrost prędkości wiatru skutkował zmniejszeniem aktywności krów o 18%, wzrostem częstotliwości odpoczynków o 19% i średniego czasu spoczynku o 10% oraz łącznego czasu spoczynku w dobie o 60 minut. Wzrost opadów powodował spadek aktywności, natomiast częstotliwość odpoczynku nie ulegała zmianie a jedynie wydłużył się średni czas spoczynku.

Słowa kluczowe: bydło, pedometr, behawior

The use of pedometers in monitoring behavior of dairy cattle

Abstract

The aim of the study was to examine the impact of variable housing conditions on the production parameters of polish holstein-friesian cows /phf/. The differentiating factors were access to the circular and the area per animal. Analysis of the results of the activity of animals belonging to the first experimental group showed that the density of the animals and the reduction in area did not show significant changes in the activity of the animals. In the second period of the experiment, there was a decrease in animal activity ($P \leq 0.01$). The frequency of rest as well as the total time of rest have decreased. The activity of group III cows was subject to statistically significant fluctuations ($P \leq 0.01$). However, the observed changes were the smallest compared to other experimental groups due to the lowest animal density per meter of area. Behavioral studies compared crossbreed cows / phf x sim / with pure-bred dairy cows phf. Higher activity of phf cattle was found during lactation and individual lactation periods. Crossbreed cattle and phf showed the highest activity in the last period of lactation – area 300 days. The lowest activity was observed in both groups in 100 days of I, II and III lactation. It was found that atmospheric conditions in the pasture determined the daily activity of the animals. The increase in wind speed resulted in a reduction of cow activity by 18%, an increase in the frequency of rests by 19% and an average resting time by 10% and a total resting time by 60 minutes. The increase in rainfall caused a decrease in activity, while the frequency of rest did not change but only the average rest time increased

Keywords: caw, pedometer, behavior

Katarzyna Godlewska[1]

Jak certyfikowane systemy jakości i bezpieczeństwa żywności wspierają pracę Urzędowego Lekarza Weterynarii?

1. Wstęp

W trosce o bezpieczeństwo żywności pochodzenia zwierzęcego prawo przewiduje jednoczesny udział nadzoru właścicielskiego oraz nadzór Inspekcji Weterynaryjnej. W obu przypadkach podstawą prawna działania są rozporządzenia unijne, w tym Rozporządzenie WE nr 852/04 oraz Rozporządzenie WE 2017/625 [16, 17]. Oba w każdym zakładzie produkującym żywność powinny być realizowane (w zakładach produkujących żywność pochodzenia roślinnego nadzór pełni Państwowa Inspekcja Sanitarna). Dodatkowo zainteresowaną stroną w obrocie gospodarczym są klienci nabywający wyroby zakładu spożywczego. Klienci ci chcą mieć potwierdzenie jakości i bezpieczeństwa żywności oraz wdrożenia obu form nadzoru. Dowodem na istnienie poukładanego systemu jakości i bezpieczeństwa żywności są wdrożone i certyfikowane systemy, takie jak: BRC Food, IFS Food oraz FSSC 22000 czy w mniejszym stopniu ISO 22000.

Wymagania tych systemów bazują na obligatoryjnym systemie HACCP oraz aktualnych regulacjach prawnych. Zawierają także mocno rozbudowane wymagania względem dobrych praktyk (higieniczna, produkcyjna, dystrybucyjna), a także dotyczące utrzymania systemu i nadzoru nad nim. Dla zakładu z powodu wdrożenia certyfikowanych systemów jakości i bezpieczeństwa żywności wymagań jest więcej niż nakłada prawo żywnościowe.

Urzędowy lekarz weterynarii pełniący nadzór nad zakładem ma obowiązek kontrolować takie wymagania prawne jak bezpieczeństwo żywności, utrzymanie systemu HACCP, prowadzenie weryfikacji systemu, zapewnienie identyfikowalności, kontrola znakowania przesyłek i produktów, legalność surowców i produktów wprowadzanych do obrotu.

2. Urzędowy lekarz weterynarii w świetle prawa

Zgodnie z ustawą o bezpieczeństwie żywności Inspekcja Weterynaryjna (IW) pełni nadzór nad produkcją żywności pochodzenia zwierzęcego [2]. Inspekcja Weterynaryjna współtworzy prawo ustawodawcze i wykonawcze w zakresie zdrowia zwierząt i zdrowia publicznego, a także realizuje zadania o weterynaryjnej kontroli granicznej, kontroli weterynaryjnej w handlu, produktach pochodzenia zwierzęcego, ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt, a także o ochronie zwierząt. Dodatkowo IW nadzoruje produkcję żywności w rolniczym handlu detalicznym zawierającą jednocześnie środki spożywcze pochodzenia niezwierzęcego i produkty pochodzenia zwierzęcego. Inspekcja ma wyznaczone zadania w zakresie badań kontrolnych zakażeń zwierząt oraz monitorowania i zwalczania chorób zakaźnych zwierząt i chorób odzwierzęcych. Kolejnym zadaniem jest badanie

[1] k_godlewska@wp.pl.

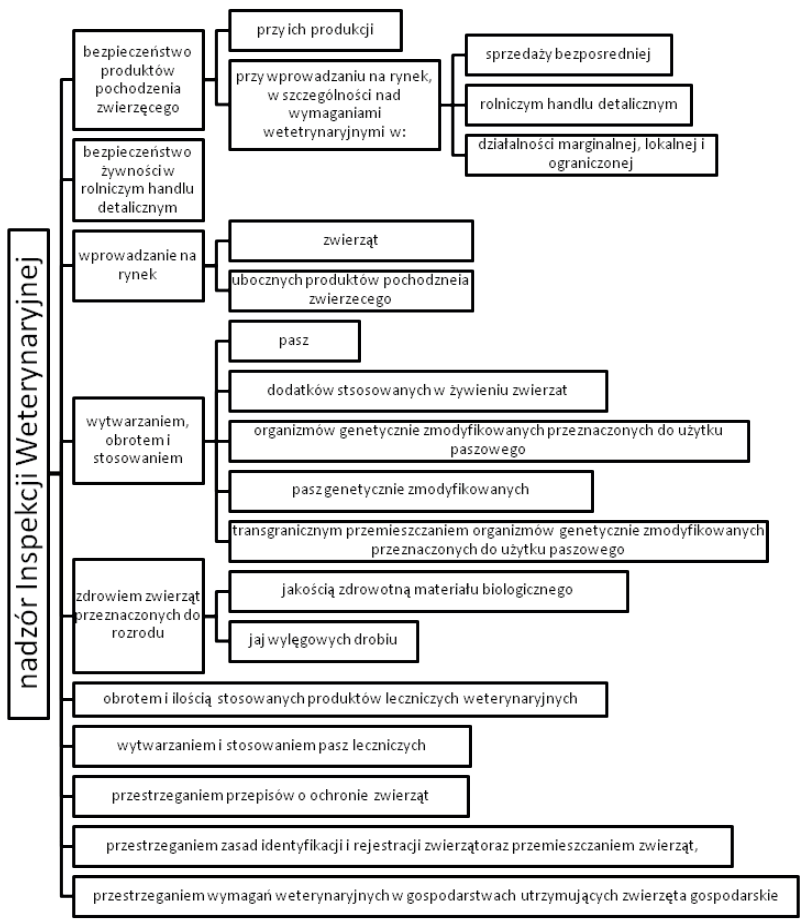
odporności na środki przeciwdrobnoustrojowe u zwierząt oraz w żywności i paszach. Do zadań Inspekcji Weterynaryjnej należy również:

• prowadzenie kontroli w miejscach wytwarzania pasz, hodowli zwierząt rzeźnych i innych zwierząt użytkowych, oraz w nadzorowanych zakładach produkujących żywność pochodzenia zwierzęcego, w tym badanie zwierząt rzeźnych oraz produktów pochodzenia zwierzęcego;

• Prowadzenie weterynaryjnej kontroli granicznej przy przyjmowaniu i przy wysyłaniu wysyłek pasz, zwierząt i żywności pochodzenia zwierzęcego;

• Sprawowania nadzoru nad obrotem zwierzętami oraz produktami z nich w zakresie bezpieczeństwa publicznego zgodnie z zasadą „od pola do stołu" [1].

Szczegółową analizę zadań Inspekcji Weterynaryjnej opracowaną na podstawie obowiązujących przepisów prawnych przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Sprawowanie nadzoru przez Inspekcję Weterynaryjną. Opracowanie własne na podstawie [1].

Oprócz powyżej wskazanych zadań Inspekcja Weterynaryjna prowadzi monitorowanie substancji niedozwolonych, pozostałości chemicznych, biologicznych, produktów leczniczych i skażeń promieniotwórczych u zwierząt, w wydzielinach

i wydalinach zwierząt, w tkankach lub narządach zwierząt, w produktach pochodzenia zwierzęcego, w żywności w rolniczym handlu detalicznym, w wodzie przeznaczonej do pojenia zwierząt, w paszach, a na podstawie uzyskanych informacji przekazuje je w obrębie Unii Europejskiej w ustalony sposób. Odpowiada też za wprowadzanie do systemu RASFF (o niebezpiecznej żywności i paszach) danych uzyskiwanych od innych inspekcji podlegających pod ministra rolnictwa [1-10].

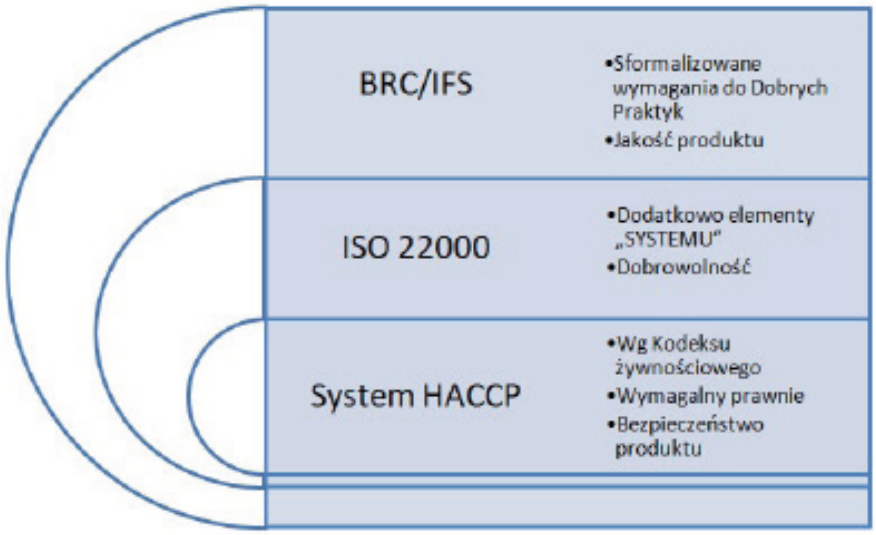
Do zadań zawiązanych z nadzorem nad bezpieczeństwem żywności realizowanych przez właściwego powiatowego lekarza weterynarii zgodnie z Ustawą o Inspekcji Weterynaryjnej zalicza się:

- sprawowanie nadzoru nad miejscami gromadzenia, skupu lub sprzedaży zwierząt, targowiskami oraz wystawami, pokazami lub konkursami zwierząt;
- badanie zwierząt umieszczanych na rynku, przeznaczonych do wywozu oraz wystawiania świadectw zdrowia;
- sprawowanie nadzoru nad ubojem zwierząt rzeźnych, w tym realizacja badania przedubojowego i poubojowego, ocena mięsa i nadzór nad przestrzeganiem przepisów o ochronie zwierząt w trakcie uboju;
- badanie mięsa zwierząt łownych;
- sprawowanie nadzoru nad rozbiorem, przetwórstwem lub przechowywaniem mięsa i wystawiania wymaganych świadectw zdrowia;
- sprawowanie nadzoru nad punktami odbioru mleka, jego przetwórstwem oraz przechowywaniem produktów mleczarskich;
- sprawowanie nadzoru nad wyładowywaniem ze statków rybackich i statków przetwórni produktów rybołówstwa, nad obróbką, przetwórstwem i przechowywaniem tych produktów oraz ślimaków i żab;
- sprawowanie nadzoru nad przetwórstwem i przechowywaniem jaj konsumpcyjnych i produktów jajecznych;
- pobieranie próbek do badań urzędowych;
- sprawowanie nadzoru nad sprzedażą bezpośrednią;
- badanie laboratoryjnego mięsa na obecność włośni;
- prowadzenie kontroli urzędowych w ramach zwalczania chorób zakaźnych zwierząt;
- kontrola dobrostanu zwierząt w środowiskach hodowlanych, transporcie, rzeźni [1, 3-6].

Urzędowy lekarz weterynarii pełniący nadzór nad zakładem ma obowiązek kontrolować takie wymagania prawne jak bezpieczeństwo żywności, utrzymanie systemu HACCP, prowadzenie weryfikacji systemu, zapewnienie identyfikowalności, kontrola znakowania przesyłek i produktów, legalność surowców i produktów wprowadzanych do obrotu [1-7, 9].

3. Systemy jakości i bezpieczeństwa żywności

System HACCP jest jedynym systemem wymagalnym prawnie, opartym o wymagania Kodeksu Żywnościowego. Na bazie systemu HACCP powstał szereg norm i standardów odnoszących się do bezpieczeństwa i jakości żywności. Wzajemne zależności tych systemów pokazano na rysunku 2.



Rysunek 2. Wzajemne zależności pomiędzy systemami jakości i bezpieczeństwa żywności [33]

Wszystkie przedstawione na tym rysunku systemy pokazane „powyżej" systemu HACCP zawierają w sobie system HACCP, ale też elementy wskazujące i stwarzające możliwość określenia jako system. Wszystkie poza systemem HACCP są dobrowolne, a ich wdrażanie wynika z zapotrzebowania rynku, czyli klienta. Elementy systemowe tworzą składowe oparte na cyklu PDCA i są to takie elementy, jak:

• Ustalone, zaplanowane działania – oznacza to, że każde działanie powinno być zaplanowane i zapisane w postaci procedury czy instrukcji, żeby wyeliminować przypadkowość działań;

• Powtarzalność – zakłada, że ten sam proces i ten sam produkt będą wykonywane tak samo, niezależnie od wykonawcy i okoliczności – zgodnie z zapisem w stosownym dokumencie – recepturze, specyfikacji, instrukcji, procedurze;

• Sprawdzanie czy działa zgodnie z założeniami – tu mieści się zarówno bieżąca kontrola procesu i produktu, ale też audytowanie i weryfikacja – procesu, produktu, systemu;

• Nadzór nad niezgodnością – jeśli niezgodność zostanie stwierdzona (w wyniku kontroli lub audytu) należy ją rozwiązać poprzez poprawę procesu, produktu, pracownika, ale też być może dokumentu źródłowego – w zależności od tego, co było przyczyną wystąpienia niezgodności;

• Doskonalenie systemu – oznacza dostosowywanie się działań, zapisów do zmieniającego się prawa, okoliczności, wymogów klienta, urządzeń oraz pracowników.

• Zaangażowanie najwyższego kierownictwa – jest wymaganiem zazwyczaj podstawowym, które wskazuje kierunek postępowania i programuje skuteczność systemu. Chodzi o to, że jeśli kierownictwo nie jest przekonane co do zasadności wdrożenia jakiegokolwiek systemu, to będzie on tylko „na papierze", a zakład będzie działał niezgodnie z opisanymi procedurami;

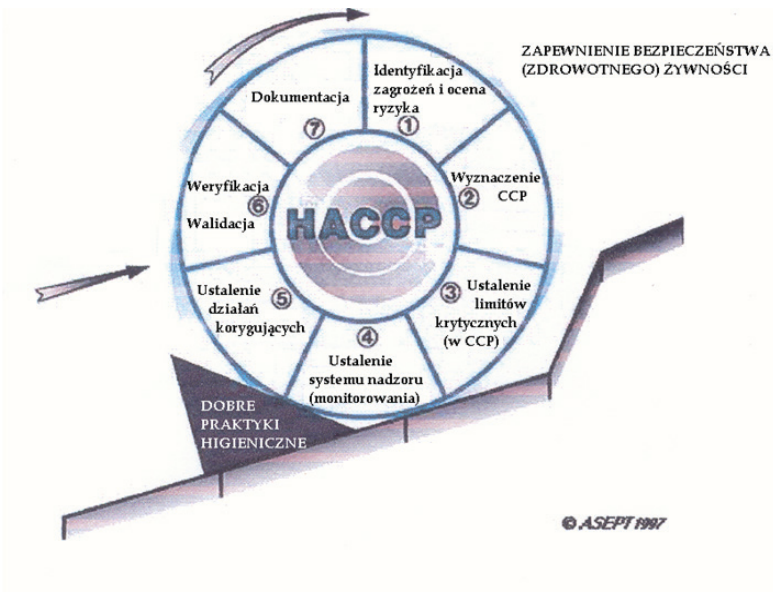
• Nastawienie na klienta – w systemach zarządzania ważny jest glos klienta i jego oczekiwania, które mogą dotyczyć jakości produktu, ale też coraz częściej społecznej odpowiedzialności biznesu [27, 28].

3.1. System HACCP

System HACCP, czyli Hazard Analysis and Critical Control Point, a po polsku „Analiza Zagrożeń i Krytyczny Punkt Kontrolny" to system zapewniający odpowiednią jakość i bezpieczeństwo zdrowotne żywności, co ma ogromne znaczenie dla zdrowia i życia konsumenta [2, 15, 24].

Analiza zagrożeń służy identyfikacji wszystkich szkodliwych czynników (biologicznych, chemicznych i fizycznych) mogących wystąpić na wszystkich etapach procesu produkcyjnego począwszy od surowców i materiałów pomocniczych, a kończąc na łańcuchu dystrybucji.

Następnie konieczne jest oszacowanie ryzyka wystąpienia konkretnego czynnika. Ostatni etap stanowi określenie środków zapobiegawczych, jakie można zastosować w celu eliminacji bądź zminimalizowania wystąpienia zagrożenia [24].



Rysunek 3. Cykl życia systemu HACCP. Źródło [24]

W wyniku przeprowadzonej analizy zagrożeń i określenia środków zapobiegawczych ustala się istotne dla procesu produkcji miejsca, elementy lub etapy procesu, w których środki zaradcze nie pomagają, czyli Krytyczne Punkty Kontrolne (CCP), które to muszą być kontrolowane ze względu na możliwość wystąpienia nadmiernego ryzyka powodującego nieakceptowaną jakość zdrowotną żywności. Zasady systemu HACCP pokazano na rysunku 3.

Warunkiem wyznaczenia CCP jest możliwość jego monitorowania oraz możliwość rzeczywistego opanowania zagrożenia. Należy dodać, że o jakości funkcjonowania systemu nie świadczy ilość wyznaczonych CCP. W zakładach z prawidłowo funkcjonującymi systemami GHP i GMP jest ona ograniczona do niezbędnego minimum – czasem może Krytyczny Punkt Kontrolny być tylko jeden lub w wyniku przeprowadzonej analizy oraz działań zapobiegawczych można stwierdzić, że nie ma potrzeby ustanawiania CCP [24].

3.2. System zarządzania bezpieczeństwem żywności wg normy ISO 22000

Norma ISO 22000 zatytułowana: „Systemy Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności – Wymagania dla każdej organizacji należącej do łańcucha żywnościowego" została opublikowana w 2018 r. i umożliwia wdrożenie systemu bezpieczeństwa żywności na zasadzie i w układzie normy ISO 9001. Celem tej normy jest harmonizacja, na skalę międzynarodową, wymagań dotyczących zarządzania bezpieczeństwem żywności w całym biznesie żywnościowym. Specyfikuje ona wymagania systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności, który łączy następujące, ogólnie rozpoznane kluczowe elementy w celu zapewnienia bezpieczeństwa żywności w łańcuchu dostaw żywności, do momentu końcowej konsumpcji [14] – pokazano je na rysunku 4.

Rysunek 4. Wymagania systemu zarządzania bezpieczeństwem żywności wg normy ISO 22000 [14]

Wzajemna komunikacja jest wymaganiem podstawowym, niezbędnym w celu zapewnienia identyfikowalności istotnych zagrożeń i ich kontroli na każdym etapie łańcucha, dlatego niezbędna jest komunikacja zarówno z dostawcami, jak i klientami. Programy wstępne to podstawowe działania i warunki, które są niezbędne, aby utrzymać w obszarze łańcucha żywnościowego higieniczne środowisko, obrót oraz zaopatrywanie w bezpieczne produkty, jak również żywność bezpieczną do spożycia przez ludzi. W zależności od tego w jakim segmencie działa dana organizacja oraz jakiego typu jest to organizacja, wymagane są programy wstępne (PRP-Prerequisite Programs) będące narzędziami wspomagającymi zapewnienie bezpieczeństwa i zaliczają się do nich: GAP (Dobra Praktyka Rolnicza), GVP (Dobra praktyka weterynaryjna), GPP (Dobra Praktyka Produkcyjna), GMP (Dobra Praktyka Wytwarzania), GHP (Dobra Praktyka Higieniczna), GDP (Dobra Praktyka Dystrybucji), GTP (Dobra Praktyka Handlowa) i inne. Zasady HACCP opierają się na wytycznych zawartych w Kodeksie Żywnościowym [14, 24].

3.3. Prywatne, popularne standardy jakości i bezpieczeństwa żywności – akceptowane przez GFSI

Międzynarodowy handel przyczynił się do zainteresowania producentów żywności wdrażaniem różnorodnych standardów dotyczących bezpieczeństwa żywności, jakości oraz innych. Standardy te powstawały jako efekt prac stowarzyszeń państw oraz związków branżowych. Powstawały w różnych miejscach świata. To jaki standard bądź wymagania, jakiej normy wdrożyć w zakładzie produkującym mleko i produkty mleczne zależy od klientów i ich oczekiwań. Powstała jednak trudność ze znalezieniem

audytorów mogących certyfikować standardy dla odbiorców z innego końca świata. Nie zawsze było to też ekonomicznie uzasadnione – tj. koszty certyfikacji w stosunku do spodziewanych zysków handlowych [30-32].

Odpowiedzią na tego typu wątpliwości było powstanie w 2000 r. GFSI (ang. *Global Food Safety Initiatve*) – Globalnej Inicjatywy dotyczącej Bezpieczeństwa Żywności po wielu kryzysach dotyczących bezpieczeństwa żywności, gdy zaufanie konsumentów do producentów, dystrybutorów i organizacji rządowych było na niskim poziomie. GFSI jest to prywatna organizacja, założona i prowadzona przez międzynarodowe stowarzyszenie handlu. Głównym celem organizacji jest zapewnienie bezpieczeństwa poprzez wypracowanie i akceptowanie systemów bezpieczeństwa żywności na poziomie światowym w całym łańcuchu dostaw. Członkami GFSI są najwięksi producenci i detaliści żywności. Współpraca odbywa się poprzez spotkania wiodących światowych ekspertów od bezpieczeństwa żywności sieci handlowych detalicznych, firm produkcyjnych i usługowych dla sektora produkcji żywności, a także organizacji międzynarodowych, rządów, środowisk akademickich i usługodawców do globalnego przemysłu spożywczego. GFSI utrzymuje system porównania poszczególnych standardów bezpieczeństwa żywności dla producentów, jak również standardów dla produkcji pierwotnej (rolniczej) na farmach. W czerwcu 2007 r. ośmiu głównych sprzedawców detalicznych, takich jak Carrefour, Tesco, ICA, Metro, Migros, Ahold, Wal-Mart i Delhaize wspólnie zaakceptowali system oceny standardów GFSI [30-32].

Rozwój marek własnych sieci handlowych przyczynił się do zwiększonego zapotrzebowania na uniwersalne narzędzia oceny producentów pozwalające zminimalizować ryzyka zlecania produkcji (po stronie właściciela marki własnej) oraz ilości audytów poszczególnych odbiorców (u dostawców produktów). Zbierając doświadczenia lat 90. mniej więcej w jednym czasie powstały dwa stowarzyszenia sieci handlowych. W Wielkiej Brytanii jest to British Retail Consortium (BRC) zrzeszające takie sieci jak m.in. Aldi, Burger King (United Kingdom) Ltd, Costa Coffee, Costcutter Supermarkets Group Ltd, Iceland Foods Ltd, Ikea Ltd, KFC, LIDL, Marks & Spencer plc, McDonald's Restaurants Ltd, Starbucks Coffee Company (UK) Ltd, Steinhoff UK Group, Subway, Tesco [12].

Akceptację GFSI mają następujące standardy BRC: BRC do żywności, wydanie 8, BRC/IoP do opakowań i materiałów opakowaniowych, wydanie 6, BRC do przechowywania i dystrybucji, wydanie 3 i BRC dla pośredników – wydanie 2 [12, 27].

Drugie podobne stowarzyszenie zostało założone przez Niemieckich i Francuskich dystrybutorów żywności, Zrzeszeni w stowarzyszeniu członkowie Niemieckiej Federacji Handlu Detalicznego – *Hauptverband des Deutschen Einzelhandels* (HDE) – wraz z członkami francuskiego odpowiednika – *Fédération des Entreprises du Commerce et de la Distribution* (FCD) – opracowali Standard jakości i bezpieczeństwa żywności nazwany Międzynarodowym Standardem Żywności (the International Food Standard (IFS), którego założeniem jest umożliwienie oceny systemów bezpieczeństwa i jakości żywności u dostawców w ujednolicony sposób. W latach 2005/2006 włoskie stowarzyszenia Associazione Nazionale Cooperative Consumatori (ANCC), Associazione Nazionale Cooperative tra Dettaglianti (ANCD) oraz Federdistribuzione także dołączyły do International Food Standard (obecnie

International Featured Standards), a opracowanie wersji 5 dla żywności było owocem współpracy federacji handlu detalicznego z Francji i Niemiec, a także sprzedawców detalicznych ze Szwajcarii i Austrii. Standard ten jest obecnie zarządzany przez IFS Management GmbH, spółkę należącą do FCD i HDE. Odnosi się do wszystkich etapów przetwórstwa spożywczego z wyłączeniem produkcji pierwotnej. W tej chwili standard jest preferowany przez takie sieci, jak Auchan, Geant, E. Leclerc, Carrefour, Real, grupa Metro i też Lidl [13].

Akceptację GFSI mają następujące standardy IFS: IFS do żywności, wydanie 6.1, IFS Logistic, wydanie 2.2, IFS PAC secure, wydanie 1.1 (do opakowań) oraz IFS dla pośredników i brokerów – wydanie 3 [13, 28].

Zarówno IFS jak i BRC od początku XXI wieku opracowują standardy ułatwiające certyfikacje w oparciu o wymagania sieci, zastępujące audyty tych sieci co jest akceptowalne przez GFSI i każdy z właścicieli standardów przez lata opracował standardy dotyczące produkcji żywności oraz inne – wspomagające nadzór nad markami własnymi. Oba stowarzyszenia prowadzą szkolenia z wymagań standardów, a także mają swoje zasady oceniania i dopuszczania do audytów audytorów.

W zależności od miejsca prowadzonej przez siebie działalności w łańcuchu dystrybucyjnym i żywnościowym można znaleźć taki standard BRC lub IFS który po zaimplementowaniu da się certyfikować okazując tym samym swoim kontrahentom wysoką kompetencję w wybranym obszarze. Szerokość zakresów standardów i wymagań poszczególnych z nich może też być użyteczną wskazówką do audytowania swoich dostawców i klientów. Wszystkie te standardy są do pobrania za darmo ze stron internetowych https://www.ifs-certification.com/index.php/en/standards dla standardów IFS oraz https://www.brcbookshop.com/ dla standardów BRC [12, 13].

4. Cel pracy

Celem pracy było porównanie wymagań prawnych z wymaganiami podstawowymi standardu BRC Food wydanie 8 oraz IFS Food wydanie 6.1, by pokazać podobieństwa, które mogą wspomóc i ułatwić pracę urzędowego lekarza weterynarii.

5. Materiał, metody

Materiałem była treść aktów prawnych oraz protokoły kontroli weterynaryjnej SPIWET oraz treść wskazanych standardów dotyczących jakości i bezpieczeństwa żywności.

Metodą pracy była analiza porównawcza wymagań prawnych, wymagań standardów oraz danych literaturowych.

6. Wyniki

W normie BRC Food wydanie 8 określonych jest 12 wymagań, bez spełnienia których przyznanie certyfikatu jest niemożliwe. Określa się je jako wymagania podstawowe. We wcześniejszych wydaniach standardu określane były jako fundamentalne i ta nazwa lepiej wskazuje na charakter tych wymagań.

6.1. Zaangażowanie najwyższego kierownictwa

Standard BRC stawia wymaganie o treści: „Najwyższe kierownictwo firmy jest zobowiązane do wykazania pełnego zaangażowania we wdrożenie wymagań Globalnej normy bezpieczeństwa żywności oraz procesów umożliwiających stałe doskonalenie zarządzania bezpieczeństwem i jakością żywności" – pkt 1.1. Oznacza

to, że poprzez politykę jakości i bezpieczeństwa żywności, asygnowanie środków na np. badania produktów i szkolenia dla pracowników powinno się przejawiać wsparcie Kierownictwa. Audytor powinien stwierdzić, czy Zarząd, Kadra Kierownicza wspiera produkcję bezpiecznej żywności, zgodnej z wymaganiami czy też oczekuje prowadzenia dokumentacji systemu niezwiązanego z faktycznymi procesami w zakładzie. Innymi dowodami na zaangażowanie kierownictwa w system będzie udział w spotkaniach zespołu ds. HACCP, zapoznawanie z wynikami audytów wewnętrznych czy omawianie spraw związanych z utrzymaniem systemu na spotkaniach managerskich itp.

Wymagania prawne w tym zakresie ograniczają się do wskazania w rozporządzeniu WE 852/04, że „główna odpowiedzialność za bezpieczeństwo żywności spoczywa na przedsiębiorstwie sektora spożywczego". Ze strony praktycznej zawsze w zakładzie musi być osoba upoważniona do przyjęcia kontroli, mająca pełnomocnictwo do reprezentowania zakładu. Zazwyczaj urzędowy lekarz weterynarii (ULW) kontaktuje się z przewodniczącym zespołu ds. HACCP, działem jakości czy kierownikiem produkcji. Niemniej jednak w trudnych sprawach ULW może oczekiwać kontaktu z właścicielem lub Zarządem. Wskazanie osoby odpowiedzianej też jest wykazane w formularzu kontroli weterynaryjnej SPIWET, gdzie należy wskazać kto był przy kontroli i reprezentował kontrolowany podmiot.

6.2. System HACCP

W kolejnym pkt 2 standardu BRC zawarto wymogi dotyczące konieczności, że „Przedsiębiorstwo musi posiadać w pełni wdrożony i skuteczny plan bezpieczeństwa żywności włączający zasady HACCP określone w Kodeksie Żywnościowym". Oznacza to, że trzeba wdrożyć co najmniej siedem zasad systemu HACCP – zgodnie z tym, co opisano w rozdziale 3.1. Przy czym standard umożliwia wdrożenie systemu HACCP jako elementu większego systemu – np. niedotyczącego tylko bezpieczeństwa żywności, ale też np. jakości żywności, autentyczności żywności oraz food defence, czyli ochrony żywności przed celowym zanieczyszczeniem.

Wymóg ten pokrywa się z wymogami prawnymi z ustawy o bezpieczeństwie żywności i żywienia oraz z rozporządzeń unijnych 17/02 i 852/04, gdzie wskazana jest konieczność wdrożenia systemu HACCP.

6.3. Audyty wewnętrzne

Zgodnie z pkt 3.4. standardu BRC „Firma musi być w stanie wykazać, że weryfikuje skuteczne stosowanie planu bezpieczeństwa żywności oraz wdrożenie wymagań Globalnej normy bezpieczeństwa żywności". Oznacza to, że w ramach samokontroli firma musi przeprowadzać okresową weryfikację skutecznego wdrożenia swojego systemu zarzadzania jakości i bezpieczeństwa żywności. Oznacza to też, że wszystkie procedury opisujące procesy i wymagania standardu BRC powinny być zaplanowane i weryfikowane regularnie, po to, by upewnić się, że są adekwatne do potrzeb zakładu.

Do tego wymagania nie ma odpowiednika prawnego. To, co pośrednio można zastosować to wymóg nakazujący przeprowadzanie weryfikacji systemu HACCP. Najszerszy opis znajduje się w rozporządzeniu 852/04 i mówi, o konieczności ustanowienia procedur, które powinny być regularnie wykonywane w celu sprawdzenia, czy środki wyszczególnione (analiza zagrożeń, wyznaczenie CCP, ustalenie limitów krytycznych, monitorowanie, działania korygujące) działają skutecznie.

6.4. Zatwierdzenie dostawców

W punkcie 3.5.1. standardu BRC odniesiono się do nakazu posiadania przez firmy skutecznego systemu zatwierdzania i monitorowania dostawców umożliwiającego stwierdzenie, że wszelkie potencjalne zagrożenia bezpieczeństwa, autentyczności, zgodności z prawem i jakości produktu końcowego wynikające z surowców (łącznie z opakowaniami bezpośrednimi) są zrozumiałe i nadzorowane". Wymóg ten ma zapewnić bezpieczeństwo wyrobów produkowanych z zakupionych surowców. Oznacza to, że najpierw firma musi określić jakie surowce kupuje, jakie opakowania i od jakich dostawców – w sensie producentów czy pośredników. Potem te dostarczane wyroby powinny zostać podzielone na kategorie ryzyka – w zależności od wpływu na produkty końcowe zakładu lub łatwość ich podmiany (surowców). A następnie powinny zostać spisane w specyfikacjach zakładowych wymagania względem tych grup i produktów – odnośnie charakterystyki fizykochemicznych, dokumentów dostawcy, wymaganych dokumentów dostawy. W zależności od tych specyfikacji i grup ryzyka należy zaplanować proces zatwierdzania.

Regulacje prawne nie określają tak dokładnych i ścisłych wymagań. Prawnie można odwołać się do identyfikowalności – co zostanie opisane w pkt. 6.6. oraz kategorii zakładu w rozumieniu prawa weterynaryjnego. Oznacza to, że jeśli zakład ma uprawnienia do handlu na terenie Unii Europejskiej to nie może kupować surowców od zakładu o niższym statusie weterynaryjnym – np. od handlu rolniczego lub marginalne, ograniczonej działalności.

6.5. Działania korygujące i zapobiegawcze

Wymaganie zawarte w pkt 3.7. stanowi, że „Firma musi być w stanie wykazać, że wykorzystuje informacje wynikające z nieprawidłowości zidentyfikowanych w systemie zarządzania bezpieczeństwem i jakością żywności do podjęcia koniecznych działań naprawczych oraz do zapobiegania ich ponownemu wystąpieniu". Oznacza ono, że jeśli w firmie, w produkcie, w zapisach, w procedurach będą stwierdzone niezgodności, to wskazane upoważnione osoby będą rozwiązywać te niezgodności – tzn. naprawią błąd co do produktu, procesu oraz wprowadzą działania, by zapobiec wystąpieniu tej samej lub podobnej niezgodności w przyszłości.

Pomimo logiczności takiego postępowania nie ma jak dotąd stosownych regulacji prawnych zawartych w prawie weterynaryjnym. Prawdopodobnie jest to związane ze swobodą prowadzenia działalności gospodarczej i w związku z tym prawodawca zostawia działania związane z zarządzaniem niezgodnościami w rękach prowadzącego działalność.

6.6. Identyfikowalność

W punkcie 3.9. zawarte jest wymaganie „Zakład musi być w stanie zidentyfikować wszystkie partie surowców (łącznie z opakowaniami bezpośrednimi) od dostawców poprzez wszystkie etapy przetwarzania i wysyłki do klientów i vice versa". Oznacza to, że nie tylko trzeba wiedzieć, jaki produkt został zakupiony, jaka jest data zakupu oraz jakie są dane sprzedawcy, ale też do jakich partii wyrobów gotowych było używane. Dotyczy to używanych surowców zasadniczych, przypraw, substancji pomagających w przetwarzaniu np. sznurka do wiązania wyrobów – jeśli ma bezpośredni kontakt z towarem i opakowań co najmniej bezpośrednich. Testy identyfikowalności mają na celu pokazanie tych powiązań – numerów partii, ale też bilansu masy. Testy należy

wykonywać poczynając od surowca – prześledzić całą ścieżkę i wszystkie partie produktów, do których był dodawany – np. dostawa pieprzu z jednym numerem partii np. 250 kg – do jakich partii wyrobów i w jakim czasie był dodawany. Testy też trzeba wykonywać zaczynając od partii wyrobu gotowego i cofając się ustalić partie wszystkich surowców.

Wymagania prawne zapisane w rozporządzeniu WE 178/02 i rozporządzeniu wykonawczym komisji WE 931/2011 wskazują na konieczność przekazywania informacji na dokumentach towarzyszących o numerze partii, a także zbierania informacji o tym, co, ile, kiedy i od kogo zostało kupione oraz co, kiedy, ile i komu zostało sprzedane/wysłane. ULW sprawdza bilanse masy badanych partii, także w zakresie wytwarzanych produktów obocznych. Załącznik II, sekcja II rozporządzenia 853/04 wskazuje na konieczność identyfikacji każdej sztuki i/lub partii zwierząt kierowanych do uboju. Ponadto w sekcji II znajdują się również wymogi dotyczące metod identyfikacji łańcucha pokarmowego gospodarstwa hodującego zwierzęta.

6.7. Układ, przepływ produktu i segregacja

Standard zawiera pkt 4.3, który jest wymaganiem podstawowym „Układ zakładu, kolejność procesów i drogi przemieszczania się personelu muszą być odpowiednie, aby zapobiec zanieczyszczeniu produktu, muszą być też zgodne z odpowiednimi przepisami prawa". Wymaganie to rozszerzone jest przez wymagania szczegółowe, ale chodzi o to, by proces produkcyjny był jednokierunkowy, tzn. przebiegał od surowców poprzez półprodukty do wyrobów gotowych. Celem jest, by na czysty wyrób gotowy nie były nanoszone zanieczyszczenia od surowców czy od personelu przenoszone przez ludzi, maszyny, ale też wentylacje czy kanalizację.

Podobne wymagania są określone w załączniku II do rozporządzenia 852/04, a dotyczą pomieszczeń żywnościowych, pomieszczeń, w których przygotowuje się i przetwarza środki spożywcze, oraz przepisy odnośnie środków spożywczych [16]. Załącznik III rozporządzenia 853/04 również się do tych wymagań odnosi i ustanawia kolejne – by zapobiegać zanieczyszczeniu – mięsa, mleka, ryb i innych rodzajów żywności pochodzenia zwierzęcego.

6.8. Utrzymanie higieny i porządku

Standard w wymaganiu podstawowym 4.11. stanowi: „Systemy utrzymania porządku i czystości muszą przez cały czas zapewniać zachowanie odpowiednich standardów higieny oraz zmniejszenie do minimum ryzyka zanieczyszczenia produktu". Realizacja tych wymagań polega na zdefiniowaniu najpierw oczekiwanego poziomu higieny – czyli określenie akceptowalnych kryteriów mikrobiologicznych, następnie określenie zdefiniowanych środków do higienizacji oraz metod służących do realizacji higienizacji. Kolejnym elementem jest weryfikacja skuteczności np. poprzez badania.

Wymagania odnośnie higieny zawierają też rozporządzenia WE 852/04 i 853/04 nie określając wszakże tak szczegółowo jak poszczególne wymagania standardu BRC Food. Poziom higieniczny zakładu i produktów reguluje rozporządzenie WE 2073/2005. Zawarte są tam parametry i zakres prowadzonych badań. Należy je potraktować jako niezbędne minimum. ULW kontroluje realizację takich badań – zakres, częstotliwość, harmonogram i wyniki. W zakładach zazwyczaj robi się szerszy zakres badań, po to, by mieć odniesienie do poziomu higieny w zakładzie i bezpieczeństwa produktu.

6.9. Nadzorowanie alergenów

Wymaganie podstawowe nr 5.3 zawiera konieczność stosowania przez zakład określonych systemów nadzorowania materiałów alergennych, umożliwiających ograniczenie do minimum ryzyko zanieczyszczenia produktów alergenami oraz zapewniających zgodność z wymaganiami prawnymi dotyczącymi oznakowywania w kraju, do którego produkt jest sprzedawany. Wymagania szczegółowe dotyczą prawidłowego znakowania produktów, znakowania zgodnie z wymaganiami kraju do którego produkt jest wysyłany oraz upewnienia się co do czystości linii produkcyjnej przed produkcją wyrobów bez alergenów.

Jeśli chodzi o wymagania prawne związane z alergenami można odnieść się do wymagań związanych ze znakowaniem – rozporządzenie WE 1169/2011 oraz do wymagań związanych z zapobieganiem zanieczyszczeniom krzyżowym – omówionym już wcześniej w rozdziale 6.8.

6.10. Kontrola operacji

Zgodnie z wymogami zawartymi w pkt 6.1. standardu BRC „Zakład musi działać zgodnie z procedurami i/lub instrukcjami pracy gwarantującymi stałe wytwarzanie produktów bezpiecznych i zgodnych z prawem, o odpowiedniej jakości oraz w pełni zgodnych z planem bezpieczeństwa żywności HACCP". Wymaganie to mówi o kontroli produktu na wszystkich etapach przetwarzania, pod kątem zgodności z wymaganiami prawnymi (bezpieczeństwo), wymaganiami jakościowymi i wymaganiami klienta.

Regulacje prawne zawarte w Rozporządzeniu 178/02 mówią tylko o konieczności zapewnienia bezpieczeństwa produktu umieszczanego na rynku.

6.11. Etykietowanie i kontrola opakowań

Odniesienie do sposobu etykietowania oraz kontroli opakowań zostało zawarte w pkt 6.2 standardu BRC. Zawarte w nim regulacje dotyczą pkt 6.2. „kontrola etykietowania produktów, zgodnie z którymi etykieta musi zapewniać prawidłowe oznakowanie i kodowanie produktów". Realizacja tego wymogu odnosi się do upewnienia się, że odpowiednie dedykowane materiały opakowaniowe są naszykowane do pakowania konkretnej partii produktu. Kontrolę taką należy przeprowadzić przed rozpoczęciem pakowania wyrobu, a następnie powtórzyć ją w środku i na końcu pakowanej partii. Oprócz doboru materiałów opakowaniowych sprawdzeniu podlega poprawność znakowania – w tym nadanie numeru partii oraz terminu przydatności.

Wymagania prawne odnoszą się do zachowania identyfikowalności, ale nie precyzują dokładnie co powinno być sprawdzone. Regulacje w tym zakresie znajdują się w Rozporządzeniach WE 178/02, 852/04 i 853/04, gdzie znajdują się dodatkowo wytyczne dotyczące formy znaku weterynaryjnego i konieczności zabezpieczenia etykiet z takim numerem przed nieuzasadnionym użyciem.

6.12. Szkolenia

Ostatni wymóg podstawowy dotyczy organizacji szkoleń (rozdział 7.1). Według reguł zawartych w ww. rozdziale pt. „Szkolenia: postępowanie z surowcami, przygotowanie, obróbka, pakowanie i obszary magazynowe". „Przedsiębiorstwo musi zapewnić, że wszyscy pracownicy wykonujący prace mające wpływ na bezpieczeństwo, zgodność z wymaganiami prawnymi i jakość produktu, mają kompetencje konieczne do wykonywania pracy, uzyskane poprzez szkolenia, doświadczenie zawodowe lub

odpowiednie kwalifikacje". W ramach realizacji tego wymagania należy opracować plany i harmonogramy szkoleń, listy szkoleń powinny zawierać podpisy pracowników oraz zakres tematyczny szkolenia, a także długość czasu trwania szkolenia. Jeśli szkolenie dotyczy zakładowej procedury lub instrukcji – powinna być ona wskazana w protokole szkolenia. Po zakończeniu szkolenia należy zweryfikować skuteczność szkolenia poprzez test sprawdzający, rozmowę z pracownikami, obserwacje ich pracy. Zakres tematyczny szkoleń zazwyczaj dotyczy wymagań standardu, w tym wymagań podstawowych, wymagań prawnych, wymagań klientów, wymagań eksportowych, technologii żywności, zagrożeń w żywności, food defence, autentyczności żywności, procedur zakładowych, ale też wyników audytów klientowskich, certyfikujących, wewnętrznych i urzędowej kontroli żywności.

Wymagania prawne odnoszą się do konieczności posiadania przez pracowników świadomości wpływu na żywność i jej bezpieczeństwo. Wymagania prawne zawarte są w rozporządzeniu WE 852/04 w załączniku II, rozdział XII – szkolenie.

6.13. Systemy jakości i bezpieczeństwa żywności a ULW

Zgodnie z prawem, ULW nie ma konieczności dostępu do dokumentacji systemu jakości i bezpieczeństwa żywności. Czasem w nadzorowanym zakładzie prowadzi się podwójną dokumentację – jedną dla ULW a drugą dla jednostki certyfikacyjnej i klientów. Wynika to czasem z tego, że zakład nie chce pokazać tego co ma zrobione „ponad standard". Zakład z wdrożonym i certyfikowany standardem BRC Food, IFS Food czy systemem FSSC 22000 to zakład „bezpieczniejszy" dla ULW, gdyż nadzoruje zdecydowanie więcej procesów i wymagań niż tylko te wymagane przez prawo. Prowadzi więcej zapisów, ma więcej procesów opisanych w procedurach i instrukcjach i często po opublikowaniu nowych wytycznych prawnych taki zakład ma te wymagania już wdrożone.

Często wymagania klientów pokrywają się z wymaganiami eksportowymi – łatwiej zatem takiemu zakładowi przygotować się do kontroli związanej z nadaniem uprawnień eksportowych i skuteczniejsza/łatwiejsza jest kontrola takiego zakładu – też ze względu na wyższy poziom świadomości związanej z bezpieczeństwem i jakością żywności oraz ze świadomością, iż rozumieniem oraz znajomością przepisów prawnych.

Innym „sojusznikiem" ULW, może być jednostka certyfikująca, która ma obowiązek reagować na zawiadomienia o nieprawidłowościach, a zatem w trudnych sytuacjach można zwracać się do takiej jednostki z prośbą o mediacje. Przykładem może być sytuacja, kiedy są wycofania produktu z rynku np. z powodu zawartości bakterii chorobotwórczych w produktach. Zdarza się, że zanieczyszczenie nie pochodzi z zakładu certyfikowanego tylko od dostawcy. Przy powtarzających się wycofaniach jednostka certyfikująca może wpłynąć na zakład i na dostawcę zakładu pod groźbą utraty/zawieszenia certyfikatu, co z kolei może grozić zerwaniem kontraktów handlowych. Ryzyko związane z utratą klienta i rynku zbytu zazwyczaj jest realną groźbą i powoduje skuteczne wdrożenie działań sprzyjających zapobieganiu kolejnym wycofaniom nakazanym przez Inspekcję Weterynaryjną.

7. Podsumowanie

Na podstawie przeprowadzonej analizy porównawczej w zakresie obowiązujących regulacji prawnych z wymaganiami podstawowymi standardu BRC Food wydanie 8 można przyjąć, że:

• standardy dotyczące jakości i bezpieczeństwa żywności zawierają szerszy wachlarz wymagań niż wymagania prawne;

• wymagania standardów mogą pokrywać się (częściowo) z wymaganiami krajów trzecich (USA, Izrael, Kanada, Japonia oraz inne);

• w zakładach z certyfikowanymi systemami zazwyczaj występuje wyższy poziom wiedzy pracowników oraz wyższy poziom świadomości pracowników i właścicieli;

• zakład prowadzi więcej dokumentacji, ma więcej procedur, instrukcji i zapisów dokumentujących ich realizację.

Wiedza i umiejętności zgromadzone w zakładzie posiadającym certyfikowany system jakości i bezpieczeństwa żywności może ułatwić pracę Urzędowemu Lekarzowi Weterynarii.

Literatura:

1. Ustawa z dnia 29.01.2004 r. o Inspekcji Weterynaryjnej. Tekst jednolity Dz.U. 2008, poz. 1557.
2. Ustawa z dnia 25.08.2006 r. o bezpieczeństwie żywności i żywienia. Tekst jednolity Dz. U. 2019, poz. 1252.
3. Ustawa z dnia 16.12.2005 r. o produktach pochodzenia zwierzęcego. Tekst jednolity Dz. U. 2019, poz. 824.
4. Ustawa z dnia 10.12.2003 r. o kontroli weterynaryjnej w handlu. Test jednolity Dz.U. 2019, poz. 475.
5. Ustawa z dnia 11 marca 2004 r. o ochronie zdrowia zwierząt oraz zwalczaniu chorób zakaźnych zwierząt (Dz. U. z 2014 z. poz. 1539).
6. Ustawa z dnia 2 kwietnia 2004 r. o systemie identyfikacji i rejestracji zwierząt (Dz. U. z 2017 r. poz. 546).
7. Ustawa z dnia 21 sierpnia 1997 r. o ochronie zwierząt (Dz. U. z 2013 r. poz. 856).
8. Ustawa z dnia 15 stycznia 2015 r. o ochronie zwierząt wykorzystywanych do celów naukowych lub edukacyjnych (Dz. U. z 2015 r. poz. 266).
9. Ustawa z dnia 27 sierpnia 2003 r. o weterynaryjnej kontroli granicznej (Dz. U. z 2014 r. poz. 424).
10. Ustawa z 22 lipca 2006 r. o paszach (Dz. U. z 2017 r. poz. 453).
11. Ustawa z dnia 22 czerwca 2001 r. o mikroorganizmach i organizmach genetycznie zmodyfikowanych (Dz. U. z 2015 r. poz. 806).
12. Standard BRC Food, wydanie 8.
13. Standard IFS Food, wydanie 6.1.
14. Norma ISO 22000:2018 Systemy Zarządzania Bezpieczeństwem Żywności – Wymagania dla każdej organizacji należącej do łańcucha żywnościowego.
15. Rozporządzenie (WE) 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 28.01.2002r. ustanawiające ogólne zasady i wymagania prawa żywnościowego, powołujące Europejski Urząd ds. Bezpieczeństwa Żywności oraz ustanawiające procedury w zakresie bezpieczeństwa żywności. Dz. U. L 31 z 1.2.2002.
16. Rozporządzenie (WE) Nr 852/2004 Parlamentu Europejskiego i Rady z dnia 29.04.2004r. w sprawie higieny środków spożywczych. Dz. U. L. 139 z 30.4.2004.
17. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) 2017/625 z dnia 15.03.2017 r. w sprawie kontroli urzędowych i innych czynności urzędowych przeprowadzanych w celu zapewnienia stosowania prawa żywnościowego i paszowego oraz zasad dotyczących zdrowia i dobrostanu zwierząt, zdrowia roślin i środków ochrony roślin, (…) Dz.U. L 95 z 7.4.2017.
18. Rozporządzenie (WE) nr 2023/2006 z dnia 22 grudnia 2006 r. w sprawie dobrej praktyki produkcyjnej w odniesieniu do materiałów i wyrobów przeznaczonych do kontaktu z żywnością Dz. U. L 384 z 29.12.2006.
19. Rozporządzenie (WE) nr 1069/2009 z dnia 21 października 2009 r. określające przepisy

sanitarne dotyczące produktów ubocznych pochodzenia zwierzęcego, nieprzeznaczonych do spożycia przez ludzi, i uchylające rozporządzenie (WE) nr 1774/2002 (rozporządzenie o produktach ubocznych pochodzenia zwierzęcego) Dz. U. L 300 z 14.11.2009
20. Rozporządzenie Komisji (UE) nr 10/2011 z dnia 14 stycznia 2011r. w sprawie materiałów i wyrobów z tworzyw sztucznych przeznaczonych do kontaktu z żywnością Dz. Urz. L 12 z 15.01.2011.
21. Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (UE) nr 1169/2011 z dnia 25.10.2011r. w sprawie przekazywania konsumentom informacji na temat żywności, (…) Dz.U. L 304 z 22.11.2011.
22. Rozporządzenie Komisji (WE) nr 2073/2005 z dnia 15 listopada 2005 r. w sprawie kryteriów mikrobiologicznych dotyczących środków spożywczych. Dz.U. L 338 z 22.12.2005.
23. Rozporządzenie wykonawcze Komisji (UE) nr 931/2011 z dnia 19 września 2011 r. w sprawie wymogów dotyczących możliwości śledzenia ustanowionych rozporządzeniem (WE) nr 178/2002 Parlamentu Europejskiego i Rady w odniesieniu do żywności pochodzenia zwierzęcego Dz.U. L 242 z 20.09.2011.
24. Godlewska K., *GHP, GMP, HACCP jako obligatoryjne narzędzia zarządzania jakością w przemyśle żywnościowym*, [w:] materiały konferencyjne konferencji nt. „Narzędzia jakości w doskonaleniu i zarządzaniu jakością, AE, Kraków 2004, s. 218-223.
25. Czarnecka-Skubina E., Godlewska K., *Evaluation of the hygienic level of meat processing plant basis on the microbiological research of raw meat product*, [w:] Safety in food production chain, red. Krasnowska G, Salejda A., Wydawnictwo UP Wrocław 2011, s. 41-49.
26. Czarnecka-Skubina E., Godlewska K., *Effect of implementation of HACCP system on the hygiene level In meat industry plant*, [w:] *Quality and processes improvement*, Borkowski S., Stasiak-Betlejewska R., Oficyna Wydawnicza Stowarzyszenia Menadżerów Jakości I Produkcji (SMJiP), Częstochowa 2012, s. 47-64.
27. Godlewska K., *Inne standardy BRC dotyczące łańcucha dostaw żywności*, Gospodarka Mięsna, październik 2017, s. 20-22.
28. Godlewska K., *Certyfikacja systemów zarządzania bezpieczeństwem żywności w zakładach mięsnych*, Rzeźnik Polski 01/162, styczeń 2013 r., s. 32-34.
29. Godlewska K., *Ocena ryzyka jako narzędzie komunikacji z najwyższym kierownictwem i kontrolerami*, Rzeźnik Polski 09/182, wrzesień 2014 r., s. 54-55.
30. Godlewska K., *Standardy bezpieczeństwa i jakości żywności*, Rzeźnik Polski 01/186, styczeń 2015 r., s. 36-37.
31. Godlewska K., *GFSI – standardy akceptowalne i porównywalne – wprowadzenie*, Forum Mleczarskie Biznes 1/2017 (27), Nathusius Investment, s. 44-46.
32. Godlewska K., *GFSI – opis standardów europejskich – cz. II standardy prywatne*, Forum Mleczarskie Biznes 4/2017 (29), Nathusius Investment, s. 61-65.
33. Hamilton. *Higiena powietrza w zakładach przemysłu spożywczego*, Materiały do szkolenia, Radzymin 17.02.2020.

Jak certyfikowane systemy jakości i bezpieczeństwa żywności wspierają pracę Urzędowego Lekarza Weterynarii?

Streszczenie

W dbaniu o bezpieczeństwo żywności pochodzenia zwierzęcego prawo przewiduje udział nadzoru właścicielskiego oraz nadzoru weterynaryjnego. Oba te nadzory regulują stosowne rozporządzenia unijne i oba w każdym zakładzie produkującym żywność powinny być realizowane. Dodatkowo zainteresowaną stroną w obrocie gospodarczym są klienci nabywający wyroby zakładu spożywczego. Klienci ci chcą mieć potwierdzenie jakości i bezpieczeństwa żywności oraz wdrożenia obu form nadzoru. Dowodem na istnienie poukładanego systemu jakości i bezpieczeństwa żywności są wdrożone i certyfikowane systemy, takie jak: BRC Food, IFS Food oraz FSSC 22000 czy w mniejszym stopniu ISO 22000.

Wymagania tych systemów bazują na obligatoryjnym systemie HACCP oraz wymaganiach prawa. Zawierają także mocno rozbudowane wymagania względem dobrych praktyk (higieniczna, produkcyjna, dystrybucyjna), a także dotyczące utrzymania systemu i nadzoru nad nim. Część z tych wymagań pokrywa się z wymaganiami prawnymi, część występuje w wymaganiach krajów trzecich – co jest istotne, jeśli producent berze udział w obrocie międzynarodowym.

Celem pracy jest pokazanie wymagań standardów dotyczących jakości i bezpieczeństwa żywności, które mogą wspomóc i ułatwić pracę urzędowego lekarza weterynarii. Metodą pracy była analiza porównawcza wymagań prawnych, wymagań standardów oraz danych literaturowych.

Na podstawie wykonanej pracy można stwierdzić, że znajomość standardów dotyczących bezpieczeństwa żywności i jakości może stanowić znaczące ułatwienie w pracy urzędowego lekarza weterynarii.

Słowa kluczowe: systemy jakości, urzędowy lekarz weterynarii

How do certified quality and food safety systems support the work of the Official Veterinarian?

Abstract

The carry for food safety of animal origin, the law provides for the participation of owner supervision and veterinary supervision. Both of these oversights are governed by relevant EU regulations and both should be implemented in every food-producing establishment. Additionally, buyers purchasing food plant products are interested parties in business transactions. These clients want to have confirmation of food quality and safety and the implementation of both forms of supervision. Evidence of the existence of a structured food quality and safety system are implemented and certified systems such as: BRC Food, IFS Food and FSSC 22000 or, to a lesser extent, ISO 22000.

The requirements of these systems are based on the obligatory HACCP system and legal requirements. They also contain very extensive requirements for good practices (hygiene, production, distribution), as well as for system maintenance and supervision. Some of these requirements is similar than legal requirements, some occur in the requirements of third countries – which is important if the manufacturer participates in international trade.

The purpose of the work is to show the requirements of standards regarding food quality and safety, which can support and facilitate the work of an official veterinarian. The method of work was a comparative analysis of legal requirements, requirements of standards and literature data.

Based on the work done, it can be concluded that knowledge of food safety and quality standards can significantly facilitate the work of an authority veterinarian.

Keywords: quality management systems, authority vetrinian

Ludmiła Kolek[1], Ilgiz Irnazarow[2]

Badanie jakości nasienia z wykorzystaniem systemu CASA

1. Wstęp

Ocena jakości plemników jest uważana za niezastąpioną część standardowych rutynowych analiz laboratoryjnych w diagnostyce płodności nie tylko mężczyzn ale również samców różnych gatunków zwierząt. W dziedzinie biologii reprodukcji bardzo ważna jest znajomość i dostępność metod, które pozwolą na ocenę zdolności rozrodczej samców.

W większości laboratoriów stosuje się konwencjonalne manualne metody analiz nasienia. Służą one do oceny objętości nasienia, liczby plemników, ruchliwości i morfologii. Są one jednak podatne na dużą subiektywność i zmienność zależną od obserwatora oraz brak standaryzacji [1-3]. Wyzwanie polega na przeprowadzeniu jednej dokładnej oceny wymienionych wyżej parametrów nasienia. Pomimo powszechnego stosowania metody manualne nie są idealne do uniwersalnego określania jakości nasienia. Dlatego też szerokim zainteresowaniem cieszą się systemy elektroniczne lub systemy wielowymiarowego obrazowania. Umożliwiają one na zdobywanie obiektywnych informacji o ruchu plemników oraz ich morfologii [4]. Zautomatyzowane systemy do badań jakości nasienia, powszechnie nazywane CASA („computer-aided sperm analysis" or „computer-assisted sperm analysis") pozwalają na zilustrowanie oraz zdefiniowanie wielu wartości opisujących ruch oraz morfologię każdego plemnika. Ponadto badane są nowe parametry, które mają pomóc scharakteryzować jakość nasienia. Obecnie na rynku dostępnych jest kilkanaście systemów CASA służących do analizy nasienia zwierząt. Są to oprogramowania zarówno komercyjne, prywatne, jak i darmowe, ogólnodostępne umożliwiające wprowadzanie zmian i własnych ustawień. Nie będą one szczegółowo omawiane w tym artykule ze względu na szybką dezaktualizację dostępnych informacji wynikającą z ciągłego rozwoju systemów CASA. Niniejsza praca prezentuje zasady funkcjonowania i możliwości, jakie systemy CASA dają w badaniach nad jakością nasienia zwierząt.

2. Parametry jakościowe nasienia

Do głównych parametrów jakościowych nasienia zaliczane są m.in.: koncentracja (liczba plemników w danej objętości próbki), objętość oraz ruchliwość. Parametry te są podstawowymi cechami, na podstawie których optymalizuje się ilość nasienia używanego do zapłodnienia. Dodatkowo bada się również zabarwienie, zapach, pH, oraz konsystencję. Analiza morfometryczna polega na pomiarze długości, szerokości, powierzchni i obwodu głowy plemnikawykonanym na wybarwionych rozmazach. Często koncentracja lub całkowita liczba plemników są nie tylko składnikiem oceny jakości nasienia, ale również pośrednim parametrem mogącym wspomagać

[1] ludmila.kolek@golysz.pan.pl, Polska Akademia Nauk Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszu.

[2] ilgiz.irnazarow@golysz.pan.pl, Polska Akademia Nauk Zakład Ichtiobiologii i Gospodarki Rybackiej w Gołyszu.

monitorowania zdrowia zwierząt. Obecnie dużą uwagę przywiązuje się do parametrów ruchowych nasienia, w tym w szczególności do ruchliwości plemników, ich prędkości oraz trajektorii ruchu. Innym ważnym narzędziem pozwalającym ocenić jakość nasienia jest analiza morfologii plemników. U prawidłowo poruszających się plemników może występować nieprawidłowa morfologia uniemożliwiająca dojście do zapłodnienia komórki jajowej. Podczas analizy morfologicznej ocenie podlega główka plemnika i integralność akrosomu, wstawka oraz witka. W plemnikach ssaków ocenie podlega również wakuolizacja. Badanie może obejmować również integralność plemnikowego DNA. Informacje dotyczące morfologii plemników (w szczególności główki) są ważne w badaniach jakości nasienia buhajów, tryków czy ogierów, dla lekarzy weterynarii przeprowadzających inseminację oraz w badaniach toksykologicznych.

Wybór odpowiednich parametrów powtarzalnymi, szybkimi i czułymi metodami jest trudny i budzi coraz większe obawy, ponieważ coraz więcej wiadomo o tym, że standardowe parametry nasienia, takie jak ruchliwość, morfologia i koncentracja plemników są niewystarczające, nie tylko do przewidzenia płodności, ale nawet do identyfikacji bezpłodnych osobników [5, 6]. W badaniach przeprowadzonych przez Gadea i in. [5] mierzono między innymi takie parametry jak objętość, koncentracja, liczba plemników czy ich ruchliwość. Tylko w przypadku ostatniego z wymienionych parametrów wykazano statystycznie istotną korelację z wynikami zapłodnienia. Z kolei Keegan i in. [6] wykazali, że parametry rozrodcze notowane przy wykorzystaniu nasienia z teratozoospermią nie różniły się od parametrów rozrodczych obserwowanych dla nasienia ocenionego jako prawidłowe.

Oprócz powyższych parametrów jakościowych nasienia, istotną cechą jest zdolność plemników do reagowania na mechanizm ukierunkowujący ich przemieszczanie się w stronę oocytu. W ostatnich latach stało się jasne, że plemniki ssaków muszą być prowadzone w celu dotarcia do komórki jajowej. Do tej pory zaproponowano trzy różne mechanizmy: termotaksję [7, 8], reotaksję [9, 10] i chemotaksję [11-13]. Każdy z tych mechanizmów jest odpowiedzią na określony bodziec, odpowiednio: gradient temperatury, przepływ płynu i gradient stężenia. Nie można wykluczyć, że ruch ukierunkowany w stronę oocytu może wynikać z kombinacji kilku tych mechanizmów [14]. Zatem badanie reakcji nasienia na te mechanizmy może być pomocne w przewidywaniu zdolności do zapłodnienia na podstawie danej próbki nasienia.

Badania przeprowadzane w ostatniej dekadzie wskazują, że sukces zapłodnienia można w dużej mierze przypisać właściwościom funkcjonalnym plemników. W związku z tym opracowano szereg badań *in vitro* w celu monitorowania kluczowych aspektów funkcji plemników: ich zdolności do przystosowywania się do zmieniających się warunków osmotycznych, wiązania się z nabłonkiem jajowodów oraz do przeprowadzania kapacytacji w odpowiedni i terminowy sposób. W ostatnich latach coraz większą uwagę zwraca się na testy związane z procesem uzdatniania (kapacytacji) jako bezpośredniego prekursora zapłodnienia (penetracji oocytu). Istotny jest również fakt, że droga do zapłodnienia komórki jajowej prowadzi przez szereg zmieniających się warunków, jak na przykład zmiana ze środowiska hiperosmotycznego na izoosmotyczne podczas ejakulacji, kontakt z moczem czy wodą (w przypadku ryb, u których występuje zapłodnienie zewnętrzne), czy kontakt z „obcymi strukturami"

jak komórki wieńca promienistego czy osłonka przejrzysta komórki jajowej [15-17]. Logiczne zatem wydaje się, że analiza jakościowa nasienia powinna obejmować testy reakcji nasienia na określone warunki środowiskowe związane z całym procesem zapłodnienia. Ostatnie badania z wykorzystaniem testów odpowiedzi nasienia na zmiany środowiskowe ujawniły znaczną heterogenność funkcjonalną u wszystkich badanych gatunków, nie tylko między osobnikami i ejakulatami, ale także w populacji plemników danego ejakulatu [18].

Przeprowadzanie badań wymienionych powyżej przy pomocy technik manualnych jest utrudnione a w wielu przypadkach nawet niemożliwe. Wymagają one użycia zaawansowanej aparatury wykonującej analizy w sposób zautomatyzowany i ujednolicony. Wówczas można mieć pewność uzyskania porównywanych i wiarygodnych wyników.

3. Manualne metody badania jakości nasienia

Manualne metody badania jakości nasienia odbywają się głównie z wykorzystaniem mikroskopu. Koncentracja plemników (mln/ml) obliczana jest przy pomocy komór zliczeniowych [19, 20]. Najczęściej używane to komora Naeubauers'a, Leja oraz komora Bürkera. Ruchliwość plemników (z wyjątkiem ruchu falowego) analizowana jest po rozcieńczeniu próbek. Na podstaiwe prędkości plemników opisuje się następujące wzorce ruchliwości: ruch postępowy, ruch bez progresji i brak ruchliwości.

Morfologia plemników, oceniana jako normalna lub nieprawidłowa, oraz ich żywotność analizowane są po zabarwieniu preparatów z rozmazem nasienia [21]. Podczas barwienia wykorzystuje się przepuszczalność błony komórkowej martwych plemników, które pochłaniają barwnik, dzięki czemu są łatwe do odróżnienia od żywych komórek. Do barwienia służy na przykład eozyna-nigrozyna [22]. W technice tej eozyna pobierana jest przez martwe komórki, natomiast nigrozyna służy d barwienia tła, aby zwiększyć kontrast między słabo zabarwionymi plemnikami a tłem. Inna metoda, korzystająca z błękitu anilinowego oraz eozyny B została opracowana przez Casaretta [23]. Kolejne techniki wykorzystują barwnik Giemsy [24], Spermac® [25], opisaną przez Bryan [26], mieszaninę eozyny Y, fast green (FCF) i naphthyl yellow do barwienia plemników ssaków. Z kolei barwienie oranżem akrydyny pozwala na zbadanie integralności DNA plemników [27].

4. Zautomatyzowane systemy badania jakości nasienia

Próby wykorzystania aparatu fotograficznego i kamery do śledzenia oraz skwantyfikowania ruchu plemników zapoczątkowano w latach 70. XX wieku. Pod koniec lat 70. po raz pierwszy zgłoszono metodę pozwalającą na analizę ruchu pojedynczych plemników na podstawie sekwencji zdjęć. Od tego czasu stopniowo opracowywano komputerową analizę nasienia (CASA) pozwalającą obiektywnie ocenić parametry ruchliwości plemników [28]. Podstawowe kryteria kinetyki plemników (cechy opisujące ruch plemników, a nie tylko proporcję komórek ruchliwych do nieruchliwych), które stosujemy dzisiaj, wywodzą się z pracy opisującej mikrokinematografię systemu działającego z prędkością nagrywania 50 klatek na sekundę [29]. W 1992 WHO wydało 3 edycję instrukcji laboratoryjnej, gdzie przedstawiono trzyliterową terminologię (np. ALH, VCL itp.) i definicje związane z ruchem plemników. Uzgodniono również dokładność wyników raportowania: mierzone wartości, takie jak prędkości do 1 miejsca po przecinku czy proporcje jako

wartości całkowite procentowe.

Rosnące zainteresowanie zautomatyzowanymi systemami do analizy ruchu plemników ze strony środowisk naukowych przyczyniło się w latach 80 do wprowadzenia na rynek pierwszych systemów CASA [30]. Na początku lat 90 Sperm Motility Quantifier (SMQ) był jednym z pierwszych systemów umożliwiających rutynową analizę nasienia przy prędkości nagrywania 50 klatek na sekundę. Obecnie systemy CASA obsługiwane są przez urządzenia pozwalające nagrywać obraz w wysokiej rozdzielczości i komputery o wyższej mocy obliczeniowej. Funkcje oprogramowania pozwalają na zautomatyzowane lub interaktywne sterowanie oświetleniem, zaawansowane filtrowanie i wychwytywanie rodzaju ruchu plemników, wykrywanie witki, inteligentne śledzenie kolizji oraz wprowadzenie fraktali jako miary kinetycznej. Poprawa dokładności i precyzji pomiarów pozwoliły sądzić, że na podstawie otrzymanych wyników możliwe będzie dokładne przewidywanie potencjalnej płodności samca (zwykle wyrażonej jako procent zapłodnionych samic lub komórek jajowych). Dzisiaj większość naukowców uznaje to za niemożliwe ze względów biologicznych nasienia per se, wpływu samicy oraz innych problemów związanych z pomiarem płodności. Dlatego też, zadaniem CASA jest umożliwienie porównania jakości różnych prób nasienia mierzonej w ten sam sposób. Niemniej jednak CASA pełni ważną i rosnącą rolę w badaniu jakości nasienia sprzedawanego do inseminacji bydła, koni lub świń oraz innych gatunków, zwłaszcza o znaczeniu gospodarskim i hodowlanym.

Obecnie, dzięki opracowaniu podstawowych norm dla wszystkich laboratoriów medycznych (ISO 15189: 2007), CASA z narzędzia badawczego zaprojektowanego do analizy ruchliwości plemników zaczęło być używane do automatycznej analizy nasienia ludzkiego na potrzeby kliniczne.

Podstawowa zasada funkcjonowania dostępnych na rynku systemów CASA opiera się na: (a) zapisywaniu następujących po sobie sekwencji obrazów zawiesiny nasienia, (b) wykrywaniu obiektów na podstawie natężenia pikseli w klatce lub rozproszenia światła, (c) użyciu specjalistycznego oprogramowania generującego pożądane informacje. Systemy dostarczają informacje w formie wartości liczbowych opisujących ruch lub morfologię każdego plemnika. Sposób poruszania się plemników jest szczegółowo zdefiniowany poprzez specyficzne parametry, natomiast przekroczenie ustalonych wartości progowych prędkości decyduje o kwalifikowaniu poszczególnych plemników jako ruchome lub nieruchome. Dokładność pomiarów jest zależna od oprogramowania systemu, jednak wartość wyjściowa ruchu plemników zależy od ich koncentracji, od medium, w którym zawieszone są plemniki oraz od wcześniejszego traktowania próbki nasienia, czyli pobierania, czy czasu i warunków przechowywania. Znaczenie ma również głębokość komory pomiarowej. Jej ograniczony rozmiar może zniekształcać ruchy plemników. Należy mieć na uwadze, że plemniki różnych gatunków zwierząt różnią się od siebie rozmiarem, kształtem, częstotliwością ruchów witki itp. Mają zatem różną prędkość i sposób poruszania się. Dlatego bardzo ważna jest optymalizacja ustawień systemu, indywidualnie dla danego gatunku.

Oprócz parametrów ruchowych niektóre systemy CASA pozwalają na równoległą analizę morfologiczną nasienia. Umożliwiają one wykrywanie obecności wakuol cytoplazmatycznych, zgięć czy innych wad w obrębie wstawki czy witki plemnika.

Większość systemów CASA może również oceniać integralność błony plazmatycznej plemnika po ekspozycji na barwniki fluorochromatyczne. Z kolei uprzednie wybarwienie suchych preparatów nasienia pozwala na wykorzystanie CASA do analizy integralności akrosomu, morfologii główki plemnika, wstawki czy witki.

5. Elementy i zasady działania systemu CASA

5.1. Optyka i rejestracja obrazu

Obraz plemnika w płaszczyźnie pola mikroskopu składa się z wielu bardziej lub mniej intensywnych punktów tworzących tzw. sferę dyfrakcyjną. Obiektyw mikroskopu tworzy uśredniony obraz, który jest rejestrowany przez detektor (układ matrycowy). Detektor ma za zadanie wykryć punkt środkowy każdej sfery dyfrakcyjnej i rejestrować jej przemieszczanie się. Analiza ruchu plemników odbywa się zazwyczaj przy czasie ekspozycji 0,02 sekundy i częstotliwości minimum 50 klatek na sekundę. Szybkość robienia zdjęć i czas trwania „sceny" (np. 50 klatek na sekundę przez 0,5 sekundy) wpływa na wynik pomiaru ruchu plemnika, który system rejestruje jako przemieszczanie się danego punktu między kolejnymi klatkami lub podczas całej sceny. Do analizy morfologicznej wykorzystuje się zwykle jedną lub dwie klatki nagrania, chociaż w niektórych systemach ocena morfologii plemników jest wynikiem średniej ze wszystkich analizowanych klatek danego nagrania.

O jakości nagrania i pomiaru decyduje użycie odpowiedniego oświetlenia. Komercyjnie dostępne systemy zapewniają szerokopasmowe oświetlenie w zakresie widzialnym (390-700 nm) lub oświetlenie wąskopasmowe uzyskane za pomocą filtrów lub LED. Analiza ruchu w świetle widzialnym odbywa się przy użyciu obiektywu z negatywnym (lub pozytywnym) kontrastem fazowym. Istnieją również systemy wykorzystujące oświetlenie bliskie podczerwieni (np. 880 nm). Większość systemów oferuje również ultrafiolet do wzbudzania barwników fluorochromowych. Istnieją systemy wykorzystujące pulsację oświetlenia, co pozwala uniknąć konieczności stosowania dużej prędkości migawki w kamerze oraz ogranicza ekspozycję nasienia na szkodliwe oświetlenie ultrafioletowe. Fluorescencyjne oświetlenie jest również stosowane w niektórych systemach do oceny nasienia barwionego jednym do trzech fluorochromów w celu wykrycia uszkodzeń błony komórkowej lub akrosomu. Dla oceny morfologii nasienia, niektóre systemy stosują kontrast fazowy lub mikroskop interferencyjno-polaryzacyjny (bezbarwna nasienie, preparat na mokro), podczas gdy inne systemy używają optyki jasnego pola (zabarwione próbki). Jeśli system jednocześnie dokonuje analizy ruchu i morfologii nasienia, wówczas stosuje się kombinację wyżej wymienionych rozwiązań .

5.2. Przygotowanie próbki i warunki pomiarów

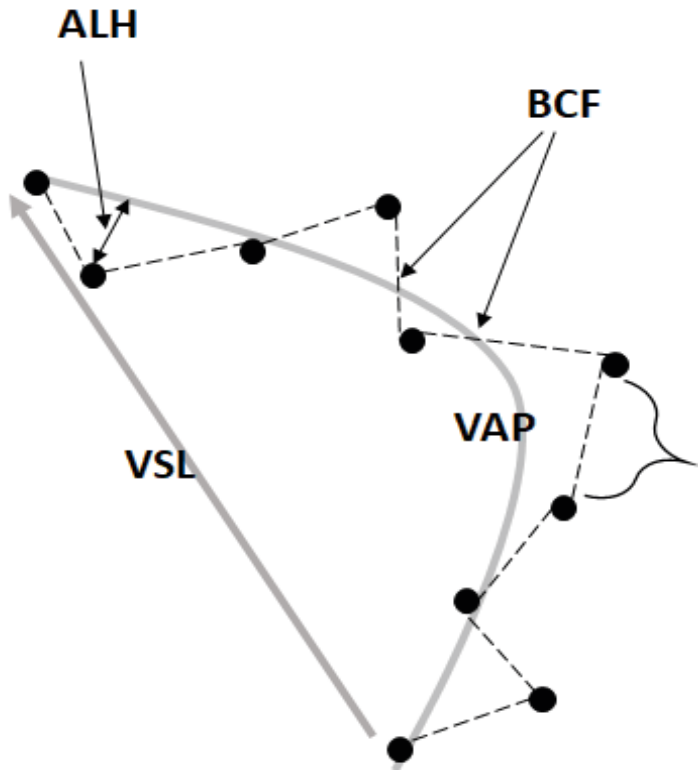
Plemniki są zwykle badane po standardowym rozcieńczeniu w złożonym buforze lub prostym roztworze soli fizjologicznej. Żadne medium nie jest podobne pod względem lepkości lub stężenia bioaktywnych jonów lub cząsteczek do płynów, na jakie plemniki są narażone w czasie drogi w kierunku komórki jajowej [31-35]. Warunki te, jak również komora, w której umieszczony jest preparat w czasie analizy, wpływają na funkcje nasienia. Komora pomiarowa ma zwykle głębokość od 10 do 20 µm. Jej wymiar powinien ograniczać możliwość poruszania się plemników w górę i w dół, ponieważ taki ruch utrudnia utrzymanie ostrości obrazu. Oznacza to jednak, że

plemniki nie mogą poruszać się w sposób swobodny, typowy dla danego gatunku. Dla przykładu, plemnik buhaja dla nieograniczonych spiralnych ruchów witki wymaga 12 μm w każdym kierunku przestrzeni [31, 36]. Ponadto, bliskość powierzchni wpływa na prędkość i sposób poruszania się plemników, które mają tendencję do przylegania do powierzchni [37-39]. Przyczyna tego zjawiska leży prawdopodobnie w napięciu powierzchniowym [40]. Zauważono również, że plemniki pływają w inny sposób w typowej 20 μm komorze niż na konwencjonalnym szkiełku.

Warunki wynikające z używania komory pomiarowej wpływają również na wynik pomiaru koncentracji plemników. Ze względu na używanie kapilar do nakładania prób nasienia na komorę plemniki są nierównomiernie rozlokowane w mm^3 objętości płynu. Po nałożeniu próbki na komorę plemniki poruszają się poprzecznie w stronę ścian komory. Zjawisko to zależy do lepkości zawiesiny oraz np. rozmiaru plemników [38]. Wpływ nierównomiernego rozkładu plemników na pomiar koncentracji nasienia można zminimalizować zawsze ustawiając obraz wzdłuż środkowej długiej osi komory oraz poprzez zastosowanie współczynnika korygującego zależnego od lepkości medium i wymiarów komory [38, 39]. Niektóre programy automatycznie uwzględniają współczynnik korygujący dla określonej komory.

5.3. Analizy przeprowadzane z użyciem CASA

Systemy CASA opisują prędkość i sposób poruszania się plemników za pomocą wartości liczbowych. Wynikiem analizy jest zestaw kilku parametrów oznaczonych według ogólnie zaakceptowanego wzorca. Do podstawowych parametrów należą: procent ruchliwych plemników (MOT), prędkość krzywoliniowa (VCL) – dystans przebyty w czasie 1 sekundy; prędkość liniowa (VSL) – prędkość obliczana na podstawie przebytej trasy i czasu potrzebnego na dotarcie od punktu 0 do punktu końcowego; średnia prędkość ścieżki (VAP) – średnia prędkość obliczana na podstawie całości przebytej trasy; liniowość ścieżki krzywoliniowej (LIN) – wartość obliczana na podstawie stosunku VSL do VAP; współczynnik kołysania (WOB) – wartość tego parametru obliczana jest na podstawie VAP/VCL; współczynnik ruchu prostoliniowego (STR), średnia i maksymalna amplituda bocznego przemieszczenia głowy (ALH), częstotliwość kołysania główki plemnika (BCF) – częstotliwość, z jaką VCL przecina VAP. Terminologię wymienionych parametrów CASA przedstawiono na rysunku 1. Dodatkowo, do niektórych systemów wprowadzono dodatkowe parametry, jak na przykład: taniec (DNC), średnie przesunięcie kątowe (MAD) czy „wymiar fraktalny" (FD), który najlepiej służy do charakteryzowania tzw. hiperaktywowanej ruchliwości i ogólnej struktury trajektorii [41]. Wartości dla każdego plemnika, zestawione dla wszystkich badanych pól, są podsumowane i uśrednione dla ponad 500 plemników, a najlepiej ponad 1000 plemników na próbkę.



Rysunek 1. Ilustracja przedstawiająca terminologię CASA. Szara strzałka wskazuje kierunek, w którym porusza się plemnik (czarny punkt). Opracowanie własne na podstawie [50]

Analizy morfologii plemników, np. badające integralność błony komórkowej, opierają się na identyfikacji koloru wcześniej zabarwionych komórek. Program zlicza liczbę np. zielonych i czerwonych komórek w danym obrazie i każdą komórkę identyfikuje jako żywotną (zieloną) lub nieżywotną (czerwoną). Podobna zasada działania obowiązuje podczas badania innych elementów morfologicznych plemników w zabarwionych preparatach.

Niektóre programy do analizy morfologii oferują możliwość klasyfikacji wizualnej, ale walidacja wyników opiera się na podstawie subiektywnych obserwacji i opisów. Obiektywna analiza polega na pomiarze długości i szerokości główki (całkowita liczba pikseli) oraz jej obwodu [42]. Umożliwia to obliczenie eliptyczności, wydłużenia, pofałdowania czy regularności kształtu głowy plemnika oraz analizę kształtu i integralności akrosomu [43, 44].

Najnowsze systemy umożliwiają porównywanie plemników w próbce nasienia różnych samców w tym samym czasie. Przygotowane próby zawiesiny nasienia umieszczane są w 1-3 komorach. System analizuje od 3 do 8 pól w każdej komorze i w każdym polu fotografuje ponad 100 plemników, z których każdy jest opisywany indywidualnie. Plemniki prezentujące zbliżone cechy przydzielane są do poszczególnych subpopulacji, różniących się między sobą odmiennymi wzorcami

ruchu. Wyniki uzyskane dla każdego plemnika w subpopulacji są sprowadzane do jednej wartości przy użyciu odpowiedniego programu obliczeniowego lub poprzez uśrednienie wartości dla wszystkich próbek, komór i pól. Tego typu analizy mają zastosowanie między innymi podczas badań toksykologicznych oraz testowania mediów mających imitować środowisko wewnątrz macicy, plazmę nasienia, czy bufory imitujące płyn jajowodowy lub aktywujące plemniki (u ryb).

Istnieją również moduły CASA umożliwiające badanie chemotaksji [41]. Plemniki umieszczone są w jednym zbiorniku a przypuszczalny chemoatraktant w innym przyłączonym zbiorniku w taki sposób, że plemniki mogą poruszać się w kierunku chemoatraktanta lub nie. Ocena reakcji plemników na użytą substancję dokonywana jest w oparciu o całkowitą liczbę przemieszczeń zarówno w kierunku chemoatraktanta, jak i w inną stronę. Po zidentyfikowaniu wszystkich ścieżek w nagranym filmie program dostarcza informacji o odsetku przemieszczeń skierowanych w kierunku badanej substancji w stosunku do tych, które nie wskazują tego ruchu.

5.4. Przewidywanie sukcesu rozrodczego na podstawie parametrów CASA

Mimo iż CASA dostarcza ogromne ilości informacji na temat jakości badanego nasienia nadal nie można jednoznacznie powiązać parametrów ruchowych z innymi właściwościami plemników, którym przypisuje się związek z płodnością samca. Pozostaje jeszcze wiele do tej pory niezidentyfikowanych właściwości nasienia mających wpływ na zdolności zapładniające plemników. Przeprowadzone dotychczas badania dają różnorodne rezultaty. Larsen i in. [45] zbadali, czy parametry ruchliwości CASA mogą uzupełniać informacje dotyczące jakości nasienia w odniesieniu do płodności populacji ogólnej mężczyzn. Na podstawie wyników wywnioskowali oni, że koncentracja plemników, całkowita liczba plemników oraz procent ruchliwych plemników są najbardziej znaczącymi parametrami w przewidywaniu płodności u ludzi.

Wyniki uzyskane przez Nagy i in. [46] podczas analizy korelacji pomiędzy płodnością a parametrami ruchowymi nasienia u buhajów wskazują, że VAP jest najbardziej użytecznym parametrem mogącym mieć kliniczne zastosowanie w badaniu ich płodności. W badaniach poświęconych płodności u jeżowców [47] wskazano, że VSL, VCL oraz VAP są silnie skorelowane z wynikami zapłodnienia, z czego najsilniejszą korelację wykazuje VAP. Inne badania, opisane przez Love [48], wykazały, że procent plemników „morfologicznie prawidłowych" oraz procent ruchliwych plemników są skorelowane z płodnością ogierów. Podczas gdy Giannoccaro i in. [49] sugerują, że jednoczesna ocena różnych parametrów jakościowych plemników za pomocą cytometrii przepływowej i CASA, może pozwolić na uzyskanie szczegółowych i powtarzalnych ocen jakości nasienia u ogierów w programach selekcji hodowlanej.

6. Podsumowanie

CASA ma ogromny potencjał jako narzędzie badawcze, w analizach klinicznych u ludzi, produkcji zwierzęcej i toksykologii reprodukcyjnej. Systemy te są nadal testowane i dostosowywane do zróżnicowanych potrzeb laboratoriów. Wprowadzane są testy funkcjonalnej jakości nasienia, które mają za zadanie pomagać w ilościowym określeniu płodności, a nie wyłącznie mierzyć opisowe parametry nasienia. Ciągłe ulepszenia technologii CASA dotyczą głównie analizy morfologii plemników, a także włączania modułów do testów funkcji nasienia. Obecne trendy w usprawnieniu

CASA celują w zapewnienie większego znaczenia klinicznego w analizie nasienia poprzez zintegrowanie automatycznej analizy parametrów nasienia i oceny czynności nasienia, a nawet powiązanie z molekularnymi i biologicznymi aspektami analizy nasienia. Tego rodzaju podejście ma również zastosowanie w hodowli w celu lepszego przewidywania płodności zwierząt.

Literatura:

1. Ginsbur K.A., Armant D.R., *The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measuremetns obtained by manual and videomicrographic analysis*, Fertitliy and sterility, 1990, Vol 53(5), s. 882-887.
2. Imade G.E., Towobola O.A., Sagay A.S., Otubu A.M., *Discrepancies in sperm count using improved Neubauer, Makler and Horwells counting chambers*, Archives of andrology, 1993, 31, s. 17-22.
3. Brito L.F.C., Greene L.M., Kelleman A., Knobbe M., Turner R., *Effect of method and clinician on stallion sperm morphology evaluation*, Therigenology, 2011, 76, s. 745-750.
4. Gago C., Perez–Sanchez F., Yeung C.H., Tablado L., Cooper T.G., Soler C., *Standarization of sampling and staining methods for the morphometric evaluation of sperm heads in the Cynomolgus monkey (Macaca fascicularis) using computer – assisted image analysis.* International Journal of Andrology 1998, 21, s. 169-176.
5. Gadea J., Selles E., Marco M.A., *The predictive value of porcine seminal parameters on fertility outcome under commercial conditions,* Reproduction in Domestic Animals, 2004, 39, s. 303-308.
6. Keegan B.R., Barton S., Sanchez X., Berkeley A.S., Krey L.C., Grifo J., *Isolated teratozoospermia does not affect in vitrofertilization outcome and is not an indication forintracytoplasmic sperm injection*. Fertility and Sterility, 2007, Vol. 88(6), s. 1583-1588.
7. Bahat A, Eisenbach M., *Sperm thermotaxis*, Mol Cell Endocrinology, 2006, 27, 252(1), s. 115-9.
8. Pérez-Cerezales S., Laguna-Barraza R., de Castro A.C., et al*., Sperm selection by thermotaxis improves ICSI outcome in mice*. *Scientific Reports,* 2018, 8(1), s. 2902.
9. Miki K., Clapham D.E., *Rheotaxis guides mammalian sperm*. Current Biology CB. 2013, 23(6), s. 443-52, pmid:23453951.
10. Bukatin A., Kukhtevich I., Stoop N., Dunkel J., Kantsler V., *Bimodal rheotactic behavior reflects flagellar beat asymmetry in human sperm cells*, Proceedings of the National Academy of Sciences, 2015, 112(52), s. 15904-15909.
11. Armon L., Eisenbach M., *Behavioral Mechanism during Human Sperm Chemotaxis: Involvement of Hyperactivation,* PLOS ONE, 2011, 6(12), s. e28359, pmid:22163296.
12. Gakamsky A., Schechtman E., Caplan S.R., Eisenbach M., *Analysis of chemotaxis when the fraction of responsive cells is small-application to mammalian sperm guidance*, International Journal of Developmental Biology, 2004, 52(5-6), s. 481-7.
13. Armon L., Caplan S.R., Eisenbach M., Friedrich B.M., *Testing Human Sperm Chemotaxis: How to Detect Biased Motion in Population Assays*, PLoS ONE. 2012, 7(3), s. e32909.
14. Eisenbach M., Giojalas L.C., *Sperm guidance in mammals – an unpaved road to the egg*, Nature Reviws Molecular Cell Biology, 2007, (4), s. 276-85, pmid:16607290.
15. Töpfer-Petersen E., Wagner A., Friedrich J., Petrunkina A., Ekhlasi-Hundrieser M., Waberski D., Drommer W., *Function of the mammalian oviductal sperm reservoir*, Journal of Experimental Zoology, 2002, 292, s. 210-215.
16. Leahy T., Gadella B.M., *Sperm surface changes and physiological consequences induced by sperm handling and storage*, Reproduciton, 2011,Vol. 142(6), s. 759-778.
17. Cosson J., *Fish sperm physiology: structure, factors regulating motility, and motility evaluation,* [w:] Biological Research in Aquatic Science, Bozkurt Y. (Ed.), 2019, DOI: 10.5772/intechopen.85139.
18. Holt W.V., Van Look K.J., *Concepts in sperm heterogeneity sperm selection and sperm competition as biological foundations for laboratory tests of semen quality*, Reproduction,

2004, 12(7), s. 527-535.
19. Ginsbur K.A., Armant D.R., *The influence of chamber characteristics on the reliability of sperm concentration and movement measuremetns obtained by manual and videomicrographic analysis*, Fertitliy and sterility, 1990, 53(5), s. 882-887.
20. Maes D., Rijsselaere T., Vyt P., Sokolowska A., Deley W., Van Soom A., *Comparison of five different methods to assess the concentration of boar seme*n. Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift, 2010, 79, s. 42-47.
21. Banaszewska D., Czubaszek M., Walczak-Jędrzejowska R., Andraszek K., *Morphometric diemnsions of the stallion sperm head depending on the staining method used*, Bulletin of the Veterinary Institute in Pulawy, 2015, 59, s. 263-270.
22. Frenau G.E., Chenoweth P.J., Ellis R., Rupp G., *Sperm morphology of beef bulls evaluated by two different methods*, Animal Reproductione Science, 2010, 118, s. 176-181.
23. Casarett G.W., *A one-solution stain for spermatozoa*, Stain Technology*,* 1953, 28(3), s. 125-127.
24. Aksoy E., Aktan T.M., Duman S., Cuce G., *Assessment of spermatozoa morphology under light microscopy with different histologic Stasin and comparison of morphometric measurements*, International Journal of Morphology, 2012, 30, s. 1544-1550.
25. Chan P.J., Corselli J.U., Jacobson J.D., Patton W.C., King A., *Spermac stain analysis of human sperm acrosomes*, Fertility and Sterrility, 1999, 72(1), s. 124-128.
26. Bryan J.H.D., *An eosin-fast green-naphthol yellow mixture for differential staining of cytologic components in mammalian spermatozoa*, Stain Technology, 1970, 45, s. 231-236.
27. KazerooniT., Asadi N., Jadid L., Kazerooni M., Ghanadi A., Ghaffarpasand F., Kazerooni Y., Zolghadr J., *Evaluation of sperm's chromatin quality with acridine orange test, chromomycin A3 and aniline blue staining in couples with unexplained recurrent abortion*,Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 2009, 26, s. 591-596.
28. Amann R.P., Waberski D., *Computer-assisted sperm analysis (CASA): capabilities and potential developments*, Theriogenology, 2014, 81(5-17) :e3.
29. David G., Serres C., Jouannet P., *Kinematics of human spermatozoa*. Gamete Research. 1981, 4, s. 83-95.
30. Mortimer D., *Objective analysis of sperm motility and kinematics*, [w:] Keel B.A., Webster B.W., editors, *Handbook of the Laboratory Diagnosis and Treatment of Infertility*, Boca Raton: CRC Press, Inc; 1990, s. 97-133.
31. Rikmenspoel R., *Movements and active moments of bull sperm flagella as a function of temperature and viscosity*, Journal of Experimental Biology, 1984, 108, s. 205-30.
32. Elofsson H., Van look K., Borg B., Mayer, *Influence of salinity and ovarian fluid on sperm motility in the fifteen-spined stickleback,* Journal of Fish Biology*,* 2003, 63(6), s. 1429-1438.
33. Satake N., Elliott R.M., Watson P.F., Holt W.V., *Sperm selection and competition in pigs may be mediated by the differential motility activation and suppression of sperm populations within the oviduct,* Journal of Fish Biology, 2006, 209, s. 1560-72.
34. Wilson-Leedy J.G., Kanuga M.K., Ingerman R.L., *Influence of osmolality and ions on the activation and characteristics of zebrafish sperm motility*, Theriogenology, 2009,71(7), s. 1054-1062.
35. Hunter R.H., Coy P., Gadea J., Rath D., *Considerations of viscosity in the preliminaries to mammalian fertilization*, Journal of Assissted Reproduction and Genetics, 2011, 28, s. 191-7.
36. Rikmenspoel R., *The tail movement of bull spermatozoa. Observations and model calculations*, Biophysical Journal, 196, 5, s. 365-92.
37. Woolley D.M., *Motility of sperm at surfaces*, Reproduction, 2003, 126, s. 259-70.
38. Douglas-Hamilton D.H., Smith N.G., Kuster C.E., Vermeiden J.P.W., Althouse G.C., *Particle distribution in low-volume capillary-loaded chambers*, Journal of Andrology, 2005, 26, s. 107-14.
39. Douglas-Hamilton D.H., Smith N.G., Kuster C.E., Vermeiden J.P.W., Althouse G.C.,

Capillary-loaded particle fluid dynamics: effect on estimation of sperm concentration, Journal of Andrology, 2005, 26, s. 115-22.
40. Lenz R.W., Kjelland M.E., Vonder Haar K., Swannack T.M., Moreno J.F., *A comparison of bovine seminal quality assessments using different viewing chambers with a computer-assisted semen analyzer*, Journal of Animal Sciences, 2011, 89, s. 383-8.
41. Moruzzi J..F, Wyrobek A.J., Mayall B.H., Gledhill B.L., *Quantification and classification of human sperm morphology by computer-assisted image analysis*, Fertility Sterillity, 1988, 50, s. 142-62.
42. Alquézar-Baeta C., Gimeno-Martos S., Miguel-Jiménez S., Santolaria .P, Yániz J., Palacín I., Casao A., Cabrian-Perez J.A., Muino-Blanco T., Perez-Pe R., *Open CASA: A new open-source and scalable tool for sperm quality analysis*, PLoS Computational Biology, 2015, 15(1), e1006691.
43. Alegre E., Gonzalez-Castro V., Garcia-Olalla O., Joshi S., *Boar spermatozoa classification using longitudinal and transversal profiles (LTP) descriptor in digital images*, Conferance paper, DOI: 10.1007/978-3-642-21073-0_36 · Source: DBLP.
44. Garcia-Olall O., Alegre E., Fernandez-Robles L.,Malm P., Bengtsson E., *Acrosome integrity assessment of boar spermatozoa images using an early Fusion of texture and contour descriptors*, Computed methods and programs in biomedicine, 2015, 120, s. 49-64.
45. Larsen L., Scheike T., Jensen T.K., Bonde J.P., Ernst E., Hjollund N.H., Zhou Y., Skakkebæk N.E., Giwercman A., *The Danish First Pregnancy Planner Study Team, Computer-assisted semen analysis parameters as predictors for fertility of men from the general population*, Human Reproduction, 2000, 15(7), s. 1562-1567.
46. Nagy A., Polichronopoulos T., Gaspardy A., Solti L., Cseh S., *Correlation between bull fertility and sperm cell velocity parameters generated by computer-assisted semen analysis*, Acta Veterinaria Hungarica, 2015, 63(3), s. 370-381.
47. Au D.W.T., Chiang M.W.L., Yet-Man Tang J., Yuen B.B.H., Wang Y., Wu R., *Impairment of sea urchin sperm quality by UV-B radiation: Predicting fertilization success from sperm motility*, Marine pollution bulletin, 2002, 44, s. 583-589.
48. Love C.C., *Relationship between sperm motility, morphology and the fertility of stallions,* Theriogenology, 2011, 76(3), s. 547-557.
49. Giannoccaro A., Lacalandra G.M., Filannino A., Pizzi F., Nicassio M., Dell'Aquila M.E., Minervini F., *Assessment of viability, chromatin structure stability, mitochondrial function and motility of stallion fresh sperm by using objective methodologies*, Journal of Cell and Animal Biology, 2010, 4(2), s. 034-041.
50. Kalbassi M.R., Lorestani R., Ghafle Marazmazi J., *Analysis of saline activator solution effects on sperm quality indices of Barbus sharpeyi by Image J software*, Iranian Journal of Fisheries Sciences, 2013, 12(2), s. 357-377.

Badanie jakości nasienia z wykorzystaniem systemu CASA

Streszczenie

Ocena jakości plemników jest uważana za niezastąpioną część standardowych rutynowych analiz laboratoryjnych w diagnostyce płodności nie tylko mężczyzn, ale również samców różnych gatunków zwierząt. W dziedzinie biologii reprodukcji bardzo ważna jest znajomość i dostępność metod, które pozwolą na ocenę zdolności rozrodczej samców. Pomimo powszechnego stosowania metody manualne nie dają gwarancji uzyskania obiektywnych i powtarzalnych wyników przeprowadzanych analiz. Dlatego też szerokim zainteresowaniem cieszą się zautomatyzowane systemy do badań jakości nasienia, powszechnie nazywane CASA. Pozwalają one na zilustrowanie oraz zdefiniowanie wielu wartości opisujących ruch oraz morfologię każdego plemnika. Ponadto umożliwiają one badanie właściwości funkcjonalnych plemników, reakcji nasienia na mechanizm ukierunkowujący ich przemieszczanie się w stronę oocytu, czy odpowiedzi nasienia na zmiany środowiskowe. Systemy dostarczają informacje w formie wartości liczbowych opisujących ruch lub morfologię każdego plemnika.

CASA pełni ważną i rosnącą rolę w badaniach toksykologicznych, w badaniu jakości nasienia sprzedawanego do sztucznego zapładniania bydła, koni lub świń oraz innych gatunków, zwłaszcza o znaczeniu gospodarskim i hodowlanym, jak również do analizy nasienia ludzkiego na potrzeby kliniczne.

Słowa kluczowe: parametry jakościowe nasienia, zasady funkcjonowania CASA, metody badania jakości nasienia

CASA systems for sperm quality testing

Abstract

Assessment of sperm quality is considered to be an irreplaceable part of standard routine laboratory analyzes in fertility diagnostics not only for men but also for males of various animal species. In the field of reproductive biology, knowledge and availability of methods that will allow to assess male reproductive capacity is very important. Despite being commonly used, the manual methods do not guarantee obtaining objective and repeatable results. These are the reasons why automated sperm quality testing systems, commonly referred to as CASA, gained such great popularity. They allow you to illustrate and define many values describing the movement and morphology of individual spermatozoa. Also, they can provide information on the functional properties of sperm, sperm reaction to the mechanism directing their movement towards the oocyte, or response to environmental changes. Systems provide information in the form of numerical values describing the movement or morphology of each spermatozoa.

CASA plays an important role in toxicological studies, in the study of the quality of semen sold for assisted insemination of cattle, horses or pigs and other species, especially of economic and breeding value, as well as for the analysis of human semen for clinical needs.Keywords: Please provide up to five keywords which express the principal topics of the paper

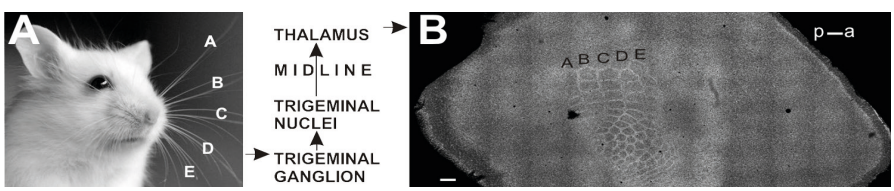
Keywords: sperm quality parameters, basis of CASA operations, sperm quality assessment methods

Ewa Siucińska[1]

Plastyczność mózgu na przykładzie kory baryłkowej myszy

1. Wstęp

Myszy wchodzą we wzajemne interakcje wydają przy tym różne dźwięki w zależności od tego czy walczą, uciekają, gonią, czy podejmują inną działalność. Porównano ponad 111 000 pojedynczych wokalizacji z ponad 32 000 przykładami różnych zachowań wśród myszy mieszanych grup samców i samic umieszczonych w komorze nagraniowej. W wielu przypadkach dominujący pisk samca był skierowany na inną mysz na przykład podczas pościgów [1]. Mysie oseski, jak i dorosłe osobniki komunikują się poprzez złożone wzorce wokalizacji ultradźwiękowej (USV) zarówno w kontekstach eksperymentalnych, jak i społecznych. Uważa się, że zmienione wzorce USV można określić podczas fenotypowania behawioralnego mysich modeli ludzkich zaburzeń neurorozwojowych i neuropsychiatrycznych [2, 3]. Czego jeszcze uczą nas myszy? Niniejszy przegląd koncentruje się na plastyczności mózgu wywołanej doświadczalnie przez deprywację, deaferentację, kompensację i uczenie się w oparciu o model projekcji czuciowej z mechanoreceptorów wibrysowych pyszczka myszy do baryłek w pierwszorzędowej korze somatosensorycznej (S1) (rys. 1) [4].



Rysunek 1. Drogi połączeń z wibrys pyszczkowych myszy do reprezentacji czuciowej w pierwszorzędowej korze somatosensorycznej S1. A. Pyszczek myszy z rzędami wibrys A-E. Impuls czuciowy z wibrys przechodzi przez zwój trójdzielny (*trigeminal ganglion*), by dalej penetrować jądra nerwu trójdzielnego (*trigeminal nuclei*) w pniu mózgu. Następnie wstęgą trójdzielną (*lemniskus trigeminalis*) na poziomie mostu przekracza linię środkową (*midline*) przechodząc na kontralateralną stronę mózgu biegnie do wzgórza (*thalamus*) i dalej do S1 [4]. B. Mikrofotografia przedstawia barwienie z użyciem barwnika Hoechst 33258 znakujące korę baryłkową. Litery A-E oznaczają rzędy baryłek. Skrawek grubości 40 μm cięty tangencjalnie do powierzchni prawej półkuli mózgu myszy. Kalibracja 100 μm, a – przód, p – tył [opracowanie własne]

Wibrysy to długie włosy zatokowe wyrastające na pyszczku gryzoni, które są reprezentowane [1]: w jądrach nerwu trójdzielnego (*trigeminal nuclei*), [2]: we wzgórzu (*thalamus*) [3]: w baryłkach 4 warstwy kory S1 Ściany baryłki budują zgrupowania neuronów, a jej wnętrze wypełnia głównie neuropil. Baryłki układają się w pięciu rzędach (A-E) tworząc pole baryłkowe, łatwo wykrywalne histologicznie. Każda baryłka oddzielona jest od sąsiedniej przegrodą – strefą ubogą w komórki.

[1] e.siucinska@nencki.edu.pl, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Pracownia Neuroplastyczności, ul. Ludwika Pasteura 3, 02-093 Warszawa.

Drogi czuciowe, przenoszące informację z wibrys do kory S1 przechodzą przez jądro brzuszne tylne przyśrodkowe wzgórza (*nucleus ventralis posterior medialis*) (VPM) i przyśrodkową część jądra tylnego wzgórza (*nucleus posterior medialis*) (POm). Drogi czuciowe z dwóch stron pyszczka krzyżują się na poziomie wzgórza i w ten sposób informacja dociera do przeciwległej półkuli mózgu. Droga wzgórzowo-korowa (VPM-S1), przewodzi informacje zorganizowane w sposób somatotopowy z pojedynczej wibrysy do pojedynczej baryłki korowej [5-7]. Neurony VPM mogą również przewodzić pobudzenie z kilku wibrys do pojedynczej baryłki korowej [8, 9]. Przegrody, którymi oddzielone są od siebie baryłki otrzymują projekcję włókien wstępujących z POm. Droga wzgórzowo-korową (POm-S1), przewodzi z reguły pobudzenie z wielu wibrys [10]. Kora S1 łączy się z większością jąder wzgórza za pośrednictwem włókien zstępujących (korowo-wzgórzowych). Drogi wstępujące i zstępujące razem tworzą wzgórzowo-korowa pętlę neuronalną. Włókna te zajmują większość torebki wewnętrznej tworząc konary wzgórza. Taki somatotopowy układ umożliwia precyzyjne zlokalizowanie zmian wywołanych modyfikacją dopływu lub siły bodźca.

Zarówno gładzenie wibrys, jak i nieprzerwana stymulacja pobudza neurony baryłek [11]. Korowa reprezentacja pojedynczej wibrysy ma postać kolumny, w której znaleziono wewnątrzkolumnowe połączenia z komórek warstwy 4 do warstw 2/3, 5, 6 [11-13]. Aktywność wejścia z wielu wibrys do przegród może wpływać na pola recepcyjne neuronów wewnątrz baryłek [14]. Neurony warstwy 3 i 4 reagują na bodźce podobnie [15] są selektywne dla kierunku i układają się grupami formującymi podjednostki wewnątrz kolumny [16]. Stymulacja czuciowa wibrysy wywołuje aktywację warstwy 4 potem 5b. Następny etap obejmuje pobudzenie warstwy 3, warstw 2/3 kolumn sąsiednich baryłek i warstwy 5a własnej kolumny. Warstwa 5a działa równocześnie z warstwą 2. Znaleziono drogi poziomo rozprzestrzeniającego się pobudzenia w warstwach: 1-4 i 5b. Neurony warstwy 5 dostają pobudzające wejście z neuronów znajdujących się w warstwie 4, 5, 6 sąsiednich kolumn [17]. Zatem dobrze poznana projekcja czuciowa wibrysy-baryłki zachęca do stawiania pytań dotyczących plastyczności mózgu. „Plastyczność układu nerwowego jest zdolnością do ulegania trwałym zmianom strukturalnym i funkcjonalnym pod wpływem przetwarzanych informacji. Zjawisko plastyczności stanowi podłoże uczenia się i pamięci, zmian rozwojowych oraz zmian kompensacyjnych po uszkodzeniach mózgu" [18]. Dziś wiemy, że wiążą się z nimi mechanizmy działania kwasu ɣ-aminomasłowego (GABA) – neuroprzekaźnika hamującego [19, 20]. Prześledźmy je na prostym modelu badawczym wibrysy-baryłki [4].

2. Plastyczność wewnątrz i poza obrębem pola baryłkowego

Deaferentacja sensoryczna spowodowana uszkodzeniem nerwów czuciowych lub mechanoreceptorów wibrysowych u nowonarodzonych gryzoni powoduje eliminację dopływu bodźców czuciowych do kory S1, co skutkuje pojawieniem się plastyczności cytoarchitektonicznej, tj. plastyczności, w której obserwuje się zmiany strukturalne w polu baryłkowym [4]. Plastyczności cytoarchitektonicznej towarzyszą: spadek immunoreaktywności GABA [21], spadek wiązania [3H] muscimolu z receptorami GABAA [22] i spadek liczby neuronów immunopozytywnych wobec glutaminianu [23].

Deprywacja sensoryczna, która jest czasowym pozbawieniem zwierzęcia dopływu bodźców z mechanoreceptorów wibrysowych powoduje zmiany funkcjonowania kolumn korowych powiązane z nienaruszoną cytoarchitektoniczną strukturą mózgu Plastyczność funkcjonalna jest bardziej aktywna u zwierząt dorosłych niż u młodocianych. Przyczyną tego zjawiska jest niedojrzałość mechanizmów plastycznych działających w korze mózgu zwierząt młodych. Cholinergiczne receptory typu muskarynowego [24, 25], metabotropowe receptory adrenergiczne z podrodziny β, pobudzające glutaminianergiczne receptory jonotropowe NMDA (kwasu N-metylo-D-asparaginowego) i AMPA (kwasu 2-amino-3-(3-hydroxy-5-metylizoxazol-4-yl) propanowego) oraz glutaminianergiczne receptory metabotropowe mają niski poziom wiązania w pierwszym tygodniu, a osiągają „dojrzałe wartości" w końcu drugiego i trzeciego tygodnia życia myszy. Zjawisko to jest skorelowane z pojawieniem się plastyczności funkcjonalnej, którą można wywołać przy pomocy deprywacji sensorycznej [26].

U zwierząt dorosłych obserwujemy plastyczność kompensacyjną, która zachodzi wewnątrz pola baryłkowego. Chirurgiczne usunięcie rzędu wibrys (lezje) wywołuje w ciągu 7 dni zmiany aktywności funkcjonalnej w polu baryłkowym. Odwzorowanie miejsc aktywnych mózgu przy pomocy techniki autoradiografii [^{14}C] 2-deoksy-D-glukozy (2DG) [27] wykazało, że odnerwiony przez uszkodzenie mechanoreceptorów obszar kory jest w pełni pobudzony przez rząd nieuszkodzonych wibrys. Obserwuje się poszerzenie reprezentacji nieuszkodzonego rzędu we wszystkich warstwach kory S1, zatem lokalne odnerwienie jest szybko kompensowane poprzez aktywność sąsiednich, nieuszkodzonych projekcji czuciowych [28]. Zablokowanie receptorów NMDA w korze S1 przez implantację syntetycznej żywicy Elvax® (DuPont Co., Wilmington, Delaware) nasyconej, APV (DL-2-amino-5-phosphonovaleric acid) ogranicza powstanie powyższych zmian kompensacyjnych [29]. U zwierząt dorosłych badanych miesiąc po uszkodzeniu mechanoreceptorów wibrysowych w deaferentowanym obszarze kory S1 nie obserwowano spadku gęstości neuronów immunopozytywnych dla GABA (GABA+) [21], a tylko przejściowe spadki poziomu wiązania [^{3}H] muscimolu do receptorów $GABA_A$. Nietrwałość tych zmian jest skutkiem plastyczności zachodzącej w korze S1. Wydaje się, że przejściowe zmniejszenie transmisji GABA-ergicznej może ułatwić powstawanie zmian plastycznych w korze poprzez ułatwienie otwarcia kanału receptora NMDA. Po zajściu zmian plastycznych, powodujących nowy rozkład pobudzenia w korze, osiąga ona nowy poziom aktywności, zatem zanika przyczyna regulacji w dół receptora $GABA_A$ [22].

Plastyczność kompensacyjna jest obserwowana również poza obrębem pola baryłkowego. U dorosłego gryzonia usunięcie wszystkich wibrys prowadzi do powiększenia się korowej reprezentacji sierści pyszczka normalnie położonej na zewnątrz reprezentacji wibrys. Co ciekawe, efekt ten obserwuje się dopiero 60 dni po operacji. Podobnie jak w przypadku lezji u dorosłego osobnika okołonarodzeniowe usunięcie wibrys pyszczkowych, z oszczędzeniem jednej wibrysy, także nie zapobiega topograficznemu powiększeniu się funkcjonalnej reprezentacji mechanoreceptorów sierści rosnącej pomiędzy wibrysami. Reprezentacje ocalałej wibrysy, jak i mechanoreceptorów sierści znaleziono w warstwie 2/3, 4, 5 kory S1 [22], zatem plastyczność kompensacyjna poza obrębem pola baryłkowego ma znacznie wolniejszy

przebieg, być może, dlatego, że projekcja aferentna niosąca informację z sierści musi przedostać się do wysoko zintegrowanego systemu pola baryłkowego kory S1 [21, 22].

3. Plastyczność indukowana warunkowaniem klasycznym

W awersyjnym warunkowaniu klasycznym – wibrysy-szok bodźcem warunkowym jest stymulacja dotykowa rzędu B wibrys, bodźcem bezwarunkowym szok elektryczny podawany w ogon [30]. Badania 2DG wykazały, że w wyniku treningu wibrysy-szok szerokość reprezentacji korowej stymulowanego rzędu wibrys w warstwie 4 i 3b powiększyła się. Obserwowana zmiana plastyczna zanika po 5 dniach. Procedura wygaszania przyspiesza zanikanie zmiany. Pseudowarunkowanie, nie powodowało zmiany szerokości wyznakowania trenowanego rzędu. Zatem trening wibrysy-szok powoduje powstanie zmiany plastycznej, w której bodźce aktywujące trenowany rząd wibrys zyskują większe znaczenie w ogólnym wzorcu aktywności elektrycznej mózgu [30]. Zablokowanie receptorów NMDA w czasie warunkowania przez implantację żywicy Elvax nasyconej, APV ogranicza powstanie powyższej zmiany plastycznej [31]. Co ciekawe, reprezentacje sąsiednich rzędów wibrys: A i C, zachowują zdolność do typowej odpowiedzi na bodźce czuciowe. Szerokość i intensywność wyznakowania 2DG rzędów baryłek A, jak i rzędów C były podobne w obu półkulach. Intensywność wyznakowania odzwierciedla stan aktywności neuronów w baryłce. Jest on uzależniony od przekaźnictwa wzgórzowo-korowego impulsu pochodzącego z wibrys oraz połączeń korowo-korowych dochodzących z sąsiednich baryłek [9]. Zatem dwie korowe reprezentacje mogą współistnieć w tej samej korowej przestrzeni i mogą być aktywowane przez różne sposoby stymulacji: [1]: przez stymulację czuciową, [2]: przez trening wibrysy-szok, a powiększenie reprezentacji korowej w wyniku warunkowania nie wywołuje redukcji reprezentacji sąsiadującej [32].

Anatomiczną podstawą do ujawnienia się takich zmian mogą być wychodzące z baryłek połączenia wewnątrzkorowe sąsiednich baryłek [33] oraz zwiększenie gęstości neuronów GABA+ wewnątrz baryłek rzędu C [34]. W skrawkach kory preparowanych dobę od zakończenia treningu zaobserwowano, że [1]: potencjały polowe wywołane stymulacją połączeń wewnątrzkolumnowych, prowadzących z warstwy 6 do 4 w obrębie kolumny odpowiadającej wibrysie stymulowanej w czasie treningu, wykazują zmniejszoną amplitudę, jak również ulegają słabszej krótkotrwałej depresji w czasie stymulacji serią bodźców o częstotliwości 40 Hz, [2]: potencjały polowe wywołane stymulacją połączeń wewnątrzkolumnowych prowadzących z warstwy 4 do 2/3 w korze baryłkowej nie ulegają modyfikacji, [3]: potencjały polowe wywołane stymulacją połączeń międzykolumnowych z 4 warstwy reprezentacji wibrysy stymulowanej w czasie treningu do warstw 2/3 sąsiedniej kolumny korowej wykazują zmniejszoną amplitudę i ulegają szybszej krótkotrwałej depresji w czasie stymulacji serią bodźców o częstotliwości 40 Hz. Zatem w efekcie warunkowania strachu następuje wybiórcze osłabienie informacji docierającej do 4 warstwy kory w reprezentacji rzędu stymulowanego w czasie treningu, a także informacji docierającej do górnych warstw sąsiednich kolumn baryłkowych [35].

Warunkowanie apetytywne wibrysy-słodka woda (stymulację wibrys rzędu B wzmacnia się podając kroplę słodzonej wody) wywołuje inne zmiany plastyczne. Krótki trening wibrysy-słodka woda indukuje poszerzenie reprezentacji trenowanego rzędu B w warstwach 2/3a i 5/6. Natomiast taki sam 2-miesięczny trening indukuje

poszerzenie reprezentacji w 4 warstwie kory S1. Pseudowarunkowanie nie zmienia szerokości wyznakowania trenowanego rzędu B [36]. Zmiany plastyczne indukowane treningiem apetytywnym mogą angażować połączenia wewnątrzkorowe, które mają również długi zasięg, wzbogacający szereg sąsiadujących ze sobą baryłek [37, 38]. Komórki przegród dają projekcje głównie do sąsiednich przegród i warstwy 2/3 [33]. W korze S1 pobudzająca wstępująca projekcja, wychodząca z neuronów warstwy 4 do 2/3, formuje precyzyjną topograficzną kolumnę [39-41]. Aksony z komórek 4 warstwy leżących blisko brzegów baryłek dają projekcję asymetryczną wewnątrz warstwy 2/3 macierzystej kolumny [42].

Przejściowy wzrost pobudliwości warstwy 2/3 kory S1 był obserwowany również, jeśli para sąsiednich wibrys była pozostawiona po jednej stronie pyszczka, podczas gdy pozostałe wibrysy były przycinane [43]. W ciągu kilku dni korowa kolumna jednej z wibrys wykazywała podwyższoną odpowiedź na stymulację pary wibrys. Sugerowano, że neurony w warstwie 2/3 i 5, które odpowiadają gwałtownie na zmiany w doświadczeniu sensorycznym mogą brać udział w modyfikacji warstwy 4 [44, 45]. Jednakże plastyczność pola recepcyjnego może pojawiać się w warstwie 4-6 także pod nieobecność warstwy 2/3 [46]. Zatem modyfikacje synaptyczne wewnątrz warstw 2/3a i 5/6 mogą być pierwszym krokiem we wzmocnieniu połączeń między kolumnami korowymi, co nie wyklucza udziału POm w tej plastyczności. Aktywność sensoryczna POm zależy od zstępujących projekcji z warstwy 3 [45]. POm może być częścią odbiorczą pętli, która reguluje wzmocnienie połączeń między kolumnami. Po dwóch miesiącach treningu wibrysy-słodka woda projekcja z VPM do warstwy 4 jest spotęgowana, a poszerzenie reprezentacji trenowanego rzędu wyraźnie widoczne. Wyniki pokazują, że efektywne połączenia synaptyczne związane z treningiem wibrysy – słodka woda są modyfikowane na różnych piętrach kory mózgu, w zależności od długości treningu, a dobrze wyuczone zadanie zmienia aktywność drogi wzgórzowo-korowej [36].

Badania elektrofizjologiczne u kotów dowiodły, że połączenia wzgórzowo-korowe wykazują plastyczność w czasie warunkowania na bodziec słuchowy [47, 48]. Warunkowanie klasyczne świnek morskich także wykazało różnice w progu pobudliwości neuronów ciała kolankowatego przyśrodkowego (corpus geniculatum mediale) – ośrodku słuchu. Udowodniono wzrost wywołanych odpowiedzi fazowych i spadek milczących lub labilnie odpowiadających neuronów w wewnętrznej części tego jądra w porównaniu z innymi okolicami wzgórza [49, 50] oraz zmiany pól recepcyjnych w korze słuchowej [51].

Plastyczności związanej z warunkowaniem awersyjnym [30] i apetytywnym [36] towarzyszą zmiany w systemie GABAergicznym kory S1 [34]. GABA powstaje z glutaminianu w reakcji katalizowanej przez enzym dekarboksylazę glutaminianową (GAD). GAD występuje w dwu izoformach GAD67 i GAD65. Synteza GABA zależna jest od interakcji enzymu z kofaktorem, fosforanem pirydoksalu (PLP). GAD67, w przeciwieństwie do GAD65, ma wysokie powinowactwo do kofaktora pozostając stale aktywny [52]. Izoformy GAD kodowane są przez oddzielne geny. Myszy pozbawione genów kodujących izoformę GAD67, mają znaczne obniżenie ilości GABA w mózgu, a brak genu GAD65 nie zmienia jego poziomu [53, 54]. Oba izoenzymy mogą występować w tej samej komórce [55]. GAD67 dominuje w ciele

komórkowym, dendrytach [52] GAD65 w pęcherzykach synaptycznych zakończeń aksonalnych współwystępuje z synaptofizyną, jest też we frakcji cytoplazmatycznej [56]. Wykazano, że pęcherzyki synaptyczne związane z błoną komórkową zawierają GAD [57, 58]. Obie izoformy są regulowane przez aktywność neuronalną [59, 60]. GAD67 przeważa w komórkach o aktywności tonicznej, a GAD65 w komórkach o aktywności fazowej [61]. GABA może być też źródłem energii – substratem do oksydacji w cyklu kwasów trikarboksylowych generującym ATP w mitochondriach, co może wskazywać na zwiększoną aktywność neuronu [59].

Zewnątrzkomórkowy poziom GABA jest regulowany przez wysoko wyspecjalizowane transportery związane z kanałami jonowymi dla Na^+/Cl^- [62]. GAT-1, jako główny neuronalno-glejowy transporter GABA w mózgu, odgrywa kluczową rolę w modulowaniu przekaźnictwa synaptycznego [63, 64] i szerokim zakresie funkcji mózgu [63-70]. Uczestniczy też w patofizjologii wielu zaburzeń neuropsychiatrycznych, w tym lęku, depresji, epilepsji, choroby Alzheimera i schizofrenii [71-82].

GABA działa na jonotropowe receptory GABAA, GABAC i metabotropowe receptory GABAB. Jednakowoż obecnie wyróżnia się dwie główne klasy receptorów GABA: jonotropowe receptory GABAA (receptory GABAC nie są już klasyfikowane jako oddzielna grupa receptorów) i metabotropowe receptory GABAB [83]. Postsynaptycznie działanie GABA zachodzi głównie za pośrednictwem receptorów jonotropowych, które są kanałami dla jonów Cl^-. W wyniku aktywacji tych receptorów dochodzi do hiperpolaryzacji i obniżenia pobudliwości błony. Aktywacja receptora GABAB redukuje uwalnianie innych neurotransmiterów z presynaptycznych zakończeń nerwowych [20].

GABA występuje w interneuronach hamujących i GABA+ neuronach projekcyjnych różnych typów [84]. Interneurony GABA+ to bezkolczyste komórki niepiramidowe, heterogenne morfologicznie i funkcjonalnie [85, 86]. Interneurony hamowania perisomatycznego tworzą synapsy na ciałach komórek piramidowych i początkowym segmencie ich aksonu regulując „wyjście" informacji z komórki. Inne tworzą synapsy na dendrytach dystalnych komórki piramidowej, gdzie modulują najbliższe „wejście" pobudzające. Aksony jeszcze innej grupy neuronów GABA+ tworzą synapsy hamujące na neuronach GABA+, w konsekwencji powodując odhamowanie neuronów piramidowych, co lokalnie zwiększa oddziaływania pobudzeniowe [87]. Wcześniejsze badania nad plastycznością kory S1 pokazały, że zmiany w systemie GABAergicznym dotyczą warstwy 4 [88, 89], kontrolującej transmisję sygnału aferentnego ze wzgórza do kory S1 [8, 90, 91], jednakże wiązanie [3H] muscimolu do receptora GABAA po treningu wibrysy-szok, ale i kontrolnej stymulacji sensorycznej było podobne [92].

Również uczenie się umiejętności motorycznych obejmuje tworzenie i/lub udoskonalanie ruchów ukierunkowanych na cel poprzez integrację sensomotoryczną. Stwierdzono np.: zwiększoną aktywność móżdżku w związku z nabywaniem zdolności motorycznych u ludzi [93-95], a uszkodzenie móżdżku powoduje braki w adaptacji istniejących programów motorycznych do nowatorskich kontekstów sensorycznych [96, 97]. Podobne wyniki stwierdzono u zwierząt, u których wystąpiły zależne od uczenia się zmiany w aktywności komórek Purkiniego [98-100].

Zmiany w gęstości neuronów GABA+, zakończeń GAD+, czy też GAT-1+ mogą mieć kluczowe znaczenie dla transmisji GABAergicznej w korze mózgu. Funkcjonalnej

reorganizacji kory S1 zachodzącej pod wpływem warunkowania strachu [30] i długotrwałego treningu wibrysy-słodka woda [36] towarzyszy wzrost gęstości małych neuronów GABA+ w warstwie 4 kory S1 w rejonie wnętrza baryłek reprezentujących trenowany rząd wibrys [34]. To ważny wynik gdyż u myszy naiwnych neurony GABA+ grupują się głównie w ścianach baryłek, podczas gdy wnętrza zawierają ich niewiele [101, 102]. Zatem może to być populacja interneuronów związana z lokalną integracją informacji wewnątrz warstwy 4 [34]. Natomiast badania hybrydyzacji *in situ* genu zawiadującego GAD67 wykazały, że zarówno stymulacja czuciowa, jak i trening awersyjny prowadzą do podobnej ekspresji mRNA GAD67 [103]. Zatem efekt podwyższonej ekspresji mRNA GAD67 poprzedza zjawisko plastyczności wywołanej treningiem, nie jest jednak jasne czy jest z nią związany. Jednakowoż, tylko w wyniku warunkowania strachu wzrasta gęstość neuronów GAD67+ we wnętrzu trenowanych baryłek [103]. Zatem wzrost gęstości neuronów GABA+ [34, 103], może wyznaczyć znaczącą frakcję w całkowitej liczbie neuronów tego obszaru wobec braku różnic w gęstości neuronów GABA+ u naiwnych zwierząt [89, 104].

W korze baryłkowej neurony GABA+ współwystępują z neuropeptydem VIP (naczynioaktywny peptyd jelitowy) [105], kalbindyną D-28 (CaBP+) [106, 107]. Dominują jednak interneurony zawierające białko wiążące wapń parwalbuminę (PV+) [108]. Są to głównie neurony koszyczkowe, odpowiedzialne za hamowanie perisomatyczne, pobudzane przez projekcje wzgórzowe [108, 109] silnie znakowane przez 2DG [107]. Micheva i Beaulieu [89], jako pierwsi zasugerowali możliwość pojawienia się nowej klasy neuronów hamujących w wyniku plastyczności związanej z doświadczeniem. Stwierdzone po treningach [34] zwiększenie gęstości neuronów GABA+ może oznaczać ujawnienie populacji neuronów, które poprzednio miały poziom syntezy GABA zbyt niski do wykrycia, a pojawiły się w wyniku warunkowania. Może to świadczyć o tym, że układ hamujący buforuje zwiększoną korową aktywność, lub jest związany z treningiem asocjacyjnym. Sama stymulacja rzędu wibrys nie wywołuje zmian w gęstości neuronów GABA+ [34], ale powoduje przejściowy wzrost wiązania radioligandów [3H]AMPA, [3H]MK-801 z miejscami wiążącymi receptorów AMPA i NMDA w wyniku wzrostu gęstości tych receptorów [31]. Jednakowoż długotrwała stymulacja czuciowa wibrys podwyższa immunoreaktywność GAD w S1 [110]. Trening wibrysy-szok [30] nie indukuje wzrostu gęstości neuronów GAD+/PV+, ale [1]: wszystkie neurony PV+ są również GAD+ [2]: około 34% neuronów GAD+ indukowanych w wyniku treningu nie zawiera PV+. Zatem inna niż GAD+/PV+ populacja neuronów GABA+ uczestniczy w procesach plastycznych [111].

Interneurony PV+ [112-115] są pobudzane bezpośrednio przez inne neurony korowe i tworzą synapsy na neuronach kolczystych [116]. Trzeba pamiętać, że synapsy wzgórzowo-korowe specyficznie i silnie pobudzają sieć PV+, a ich połączenia chemiczne i elektryczne funkcjonują niezależnie od siebie [117, 118]. Dziś wiemy, że w plastyczność indukowaną treningiem wibrysy-szok [30] zaangażowane są interneurony somatostatynowe [119]. Niemniej jednak interneurony PV+ kontrolują rytm, a cholecystokininowe (CCK+) tryb pracy sieci neuronalnej [120]. Wiemy, że warunkowanie strachu nie wpływa na neurony GAD+/PV+ [111], co nie zmienia rytmu, ale czy wpływa na tryb pracy sieci neuronalnej w obszarze wnętrza trenowanych baryłek?

Stosunkowo dużo CCK znajdujemy w korze mózgu, gdzie często współwystępuje

z GABA [121]. „Cholecystokinina występuje również w neuronach podwzgórza, przegrody i ciała migdałowatego, towarzyszy komórkom dopaminergicznym pola brzusznego nakrywki. W zawierających cholecystokininę neuronach rdzenia przedłużonego i mostu rozpoczynają się drogi zstępujące do rogów tylnych rdzenia kręgowego. Stwierdza się tu jej kolokalizację z serotoniną" [122].

Neurony CCK+ dostają projekcję glutaminianoergiczną, projekcję GABAergiczną, oraz projekcje z lokalnych interneuronów karletyninowych (CaR). Oprócz tego dostają silną podkorową projekcję serotoninergiczną z jądra środkowego górnego (pośrodkowego) szwu (nucleus raphes centralis superior vel medianus). Pobudzone receptory serotoninowe 5-HT3 podobnie jak cholinergiczne receptory nikotynowe α7 lub α4 (nikotynowe receptory dla acetylocholiny) są selektywnie wyrażane na interneuronach CCK+, dając znaczny efekt anksjolityczny [87]. Ważną cechą interneuronów CCK+ są presynaptycznie umieszczone receptory kannabinoidowe typu 1 (punkty CB1+) [123], modyfikujące ich funkcjonowanie [124]. Kontrola hamowania komórek zaangażowanych w wewnątrzkorowe przekazywanie informacji może być również zależna od endokanabinoidów. Obserwujemy związany z warunkowaniem strachu [30] wzrost ekspresji punktów CB1+ wewnątrz trenowanych baryłek [125].

Plastyczność kory mózgu jest regulowana poprzez kooperacje lub asocjacje pomiędzy blisko siebie położonymi synapsami umieszczonymi na indywidualnych neuronach piramidowych [126]. Endokannabinoidy są wstecznymi neuroprzekaźnikami w różnych formach plastyczności synaptycznej, redukują też wydzielanie CCK. Na przykład depolaryzacja komórki piramidowej lub mobilizacja wewnątrzkomórkowych jonów wapnia wywołuje aktywację presynaptycznych receptorów CB1, co wpływa na krótkotrwałą supresję wydzielania transmitera GABA z hamującego zakończenia aksonalnego [127, 128], ale także supresję wydzielania glutaminianu [129]. Aktywność presynaptycznie umieszczonych receptorów metabotropowych dla glutaminianu z grupy I – mGlu5 sprzyja syntezie endokannabinoidów, co redukcje wydzielanie glutaminianu z zakończeń presynaptycznych [130]. Zatem w korze mózgu endokannabinoidy są zaangażowane w presynaptyczną regulację obu transmisji: GABAergicznej i glutaminianergicznej, toteż potencjalnie mogą być celem dla testowania nowych form farmakoterapii lęku. Benzodiazepiny, obecnie używane, jako anksjolityki, działają głównie przez receptory GABAA zawierające podjednostkę α2 [131]. Presynaptyczne umieszczenie receptorów CB1 sprawia, że interneurony CCK+ są również wrażliwe na anksjolityki [132]. Istnieją doniesienia, że zmiany chorobowe mózgu takie jak epilepsja czy napady lękowe są związane z nieprawidłową synchronizacją rytmu i trybu działania sieci neuronów korowych [120, 134-136]. Z drugiej strony, poznano już sześć różnych receptorów włączonych w zaburzenia trybu pracy mózgu objawiające się nadmiernym lękiem: 5-HT3, nikotynowe α7 i α4, CB1, GABAAα2, estrogenowe α, w które wyposażone są neurony CCK+ [120]. Zatem dobre zbalansowanie współpracy interneuronów CCK+ w sieci korowej może być aktywnym elementem wpływającym na przekazywanie informacji w korze mózgu.

Dobę po warunkowaniu strachu [30] we wnętrzu baryłek reprezentujących wibrysy aktywowane podczas treningu występuje 50% podwyższenie gęstości punktów GAD67+ [137], bez zmian w poziomie mRNA GAD65 i punktów GAD65+ [138]. Przypuszcza się, że wzorce ekspresji obu izoform są komplementarne, związane

z różnym czasowym mechanizmem regulacji tych enzymów w wyniku treningu awersyjnego [137].

Proces uczenia się i tworzenia śladów pamięciowych zmienia liczby synaps i kolców dendrytycznych [139, 140] w wielu rejonach kory. Warto zauważyć, że również we wnętrzu trenowanej baryłki, po treningu wibrysy-szok [30], wzrasta liczba synaps hamujących na szyjce kolca dendrytycznego [141], stwierdzono też zwiększoną ekspresję punktów neuronalno-astrocytarnego transportera GAT-1 [68]. Intrygujące dane przedstawiono w odniesieniu do astrocytów używając kory wzrokowej myszy jako systemu modelowego. Otóż astrocyty wydzielają trombospondynę i białka z rodziny Sparcl1, sprzyjające tworzeniu strukturalnych/milczących synaps, które zawierają tylko receptory NMDA. Zidentyfikowano też białka z rodziny Gpc (Gpc4 i Gpc6) jako czynniki wydzielane przez astrocyty, które promują tworzenie funkcjonalnych synaps zawierających receptory AMPA przepuszczające wapń do synaps [142, 143]. Niedojrzałe synapsy zawierają przepuszczalne dla wapnia receptory glutaminianowe GluA1 AMPA, zastępowane nieprzepuszczalnymi dla wapnia receptorami GluA2 AMPA, gdy synapsy stabilizują się i dojrzewają u osobnika dorosłego. Udowodniono stosując biochemiczne frakcjonowanie białek wydzielanych przez astrocyty i spektrometrię masową, że Chrdl1 jest konieczne/wystarczające do tworzenia nieprzepuszczalnych dla wapnia dojrzałych receptorów GluA2 AMPA. Metoda hybrydyzacji in situ pokazała, że ekspresja Chrdl1 osiąga wartości szczytowe między 12. a 14. dniem po urodzeniu myszy. Poza tym, Chrdl1 wykazuje heterogeniczny wzór ekspresji, z najsilniejszą ekspresją znajdującą się w astrocytach warstwy 2/3, napędzając przełącznik AMPAR GluA1 do receptora GluA2 w synapsach podczas rozwoju mózgu. Ten wynik pokazuje, że astrocyty odgrywają istotną rolę w regulowaniu zamykania plastyczności okresu krytycznego w dojrzewającym mózgu. Myszy z nokautem Chrdl1 (KO), jak i ludzie z mutacjami w Chrdl1 „wykazują lepsze uczenie się". Zatem astrocyty promując dojrzewanie synaps ograniczają plastyczność synaptyczną [144].

W modelu uczenia polegającym na warunkowaniu mrugnięcia okiem w kolejnych sesjach treningowych stwierdzono, wzrost poziomu GABA w niezbędnej do wytworzenia odruchu korze móżdżku [145]. Warunkowanie lękowe jest łączone z bramkującą rola GABA w rejonie bocznego jądra ciała migdałowatego (nucleus lateralis amygdalae) [146]. Jednakże sama długotrwała stymulacja czuciowa może także znacząco zmieniać hamowanie korowe [110, 147].

Awersyjny [30] i apetytywny [36] trening powoduje przemodelowanie reprezentacji trenowanych wibrys w różnych warstwach kory S1. Strach i ból w treningu awersyjnym, przyjemność i satysfakcja w treningu apetytywnym aktywują różne neuronalne ścieżki. Może to różnie oddziaływać na neuromodulację angażując szlaki, wpływające na plastyczność kory mózgu. Obecność acetylocholiny wydaje się być krytyczna dla uczenia i plastyczności [148]. Stymulacja cholinergicznego jądra podstawnego wielkokomórkowego (Meynerta) (nucleus basalis magnocelularis) łączona z bodźcem słuchowym indukuje zmiany plastyczne w pierwszorzędowej korze słuchowej [149]. U gryzoni nowa stymulacja pochodząca ze wzbogaconego środowiska, aktywuje system noradrenergiczny [150]. Noradrenalina jest wydzielana w korze w wyniku stymulacji sensorycznych [151, 152]. Dopamina aktywowana

w procesie nagrody powinna być brana pod uwagę w analizie korowej plastyczności związanej z warunkowaniem apetytywnym [153].

Pokazano też plastyczność w korze słuchowej indukowaną przez stymulację pola brzusznego nakrywki (*area tegmentalis ventralis* – VTA) [154]. Aktywacja cholinergicznych receptorów muskarynowych kory wzrokowej, ułatwia plastyczność synaptyczną w warstwie 2/3, takiego efektu nie obserwuje się po aktywacji receptorów serotoninergicznych 5-HT2c. Co ciekawe, aktywacja receptorów 5-HT2c ułatwia powstanie długotrwałego wzmocnienia synaptycznego (LTP) i plastyczności warstwy 4, gdzie aktywacja receptorów muskarynowych jest niewielka [155].

Badania wykazały, że krótkotrwały trening apetytywny wibrysy-słodka woda [36] indukuje plastyczność w warstwach 2/3a i 5/6 toteż przypuszczalnie włącza aktywację kory przez receptory wrażliwe na acetylocholinę, podczas gdy trwający tyle samo trening awersyjny wibrysy-szok [30] ma silniejszy efekt w warstwie 4, w której występują obficie receptory serotoninowe. Dystrybucja receptorów serotoninowych podkreśla wzorzec pola baryłkowego w korze osesków, a formowanie pola baryłkowego silnie zależy od poziomu serotoniny [156]. Różna aktywacja ścieżek neuromodulacyjnych w przypadku obu treningów może być jedną z przyczyn różnej lokalizacji zmian plastycznych w korze S1.

Funkcjonalne zmiany w korze S1 powstają też dzięki kontrolowaniu pobudliwości pojedynczych neuronów (próg, wielkość, kształt, umiejscowienie pola recepcyjnego) przez wewnątrzkorowy mechanizm GABAergiczny, modulowany przez wpływ cholinergiczny [157]. Wydaje się możliwe, że warunkowanie wibrysy-słodka woda rozpoczyna modyfikacje synaptyczne wewnątrz warstw 2/3a i 5/6, wzmacniające połączenia między kolumnami. W zmianach tych może być zaangażowane POm, dające projekcje do warstw 2/3 w S1, jak również do przegród między baryłkami [158]. Aktywność POm zależy od zstępujących projekcji z warstwy 3 [14] i warstwy 5 [159]. Uczenie asocjacyjne powoduje, że projekcja z VPM jest spotęgowana, co wpływa na aktywność neuronów GABA+ kory S1. Dlatego można zaobserwować wzrost gęstości neuronów GABA+ [34, 103], punktów GAD67+ [137], punktów GAT-1+ [68], inhibicyjną synaptogenezę [141] w warstwie 4 kory S1. Lokalny wzrost GABA może drogą odhamowania ułatwić rozprzestrzenianie się wzmocnionego impulsu z warstwy 4 do sąsiednich rzędów baryłek. Może się to odbywać przez bezpośrednie połączenia GABAergiczne wewnątrz baryłki [160] lub przez wzajemne oddziaływanie wewnątrz tej samej kolumny [161] oraz równoległy odbiór z dwóch neuronów hamujących tego samego typu połączonych synapsami elektrycznymi [162] wystarczająco silnych żeby zsynchronizować potencjał czynnościowy w połączonych interneuronach. Synapsy, które przekazują czuciową informację ze wzgórza pobudzają sieć interneuronów PV+ wytwarzających krótkotrwałe szybkie potencjały czynnościowe FS (fast-spiking). Autoradiografia 2DG łączona z immunocytochemią dla GAD+/PV+ pokazała, że ta podklasa interneuronów jest silnie aktywowana w czasie swobodnego badania terenu przez zwierzęta [107, 163].

Nie mamy danych mówiących, co dzieje się w kolejnych dniach po warunkowaniu. Prawdopodobnie interneurony PV+ są nieelastyczną populacją, która jest niezbędna dla bazowej korowej aktywności, podczas gdy neurony CCK+ [120] lub/i receptory metabotropowe dla acetylocholiny odpowiadają za regulacje plastyczności

synaptycznej w aktywowanych obszarach kory [164]. Interneurony somatostatynowe z warstwy 4 głównie tworzą połączenia z neuronami warstwy 4, formują drogę hamowania wewnątrz połączeń baryłkowych [165]. W polu baryłkowym neurony GABAergiczne, które są postsynaptyczne w stosunku do GABAergicznych zakończeń aksonalnych mogą być anatomiczną podstawą dla odhamowania [166, 167]. Zmniejszenie hamowania wzmacnia aktywność receptorów NMDA [168] wpływając na wzrost poziomu białka PSD-95 kotwiczącego receptory glutaminianowe w błonie postsynaptycznej [169] oraz wzrost liczby receptorów NMDA [31]. Stwierdzono, zmiany konfiguracji połączeń neuronalnych, w których neuroprzekaźnik GABA odgrywa ważną rolę kontrolną [170, 171]. Również wewnątrz trenowanej wibrysy-szok baryłki wykryto zwiększoną gęstość polirybosomów w synapsach pobudzających i hamujących zlokalizowanych na kolcach dendrytycznych. Polirybosomy są strukturalnym markerem wzmocnionej aktywności synaptycznej w czasie uczenia asocjacyjnego [172]. Dobę po warunkowaniu strachu [30] w trenowanych baryłkach w porównaniu do baryłek strony kontrolnej stwierdzono wzrost gęstości punktów CB1+ oraz komplementarną dystrybucję punktów PV+ i punktów CB1+ w kolumnie korowej [125]. Zatem w plastyczność mózgu zależną od warunkowania strachu mogą być włączone interneurony CCK+ odpowiedzialne za tryb hamowania perisomatycznego [173]. Jestem przekonana, że przedstawione tu odkrycia przydadzą się do tworzenia i testowania nowych leków przeciwlękowych. Do takich badań proponowałabym np.: inhibitory enzymu hydrolizującego endokannabinoidy, które poprzez presynaptyczne podniesienie poziomu endokannabinoidów dają nadzieje kliniczne. Pokonanie lęku wzmocni chęci do uczenia się, pokonywania przeciwności, podejmowania nowych zadań.

Literatura:

1. Warren M.R., Clein R.S., Spurrier M.S., Roth J.P., Neunuebel J.P., *Ultrashort-range, high-frequency communication by female mice shapes social interactions,* Sci Rep. 10, 2020, 2637.
2. Scattoni M.L., Crawley J., Ricceri L*., Ultrasonic Vocalizations: A tool for behavioural phenotyping of mouse models of neurodevelopmental disorders,* Neurosci Biobehav Rev. 33, 2008, s. 508-515.
3. Sangiamo D.S., Warren M.R., Neunuebel J.P., *Ultrasonic signals associated with different types of social behavior of mice,* Nat Neurosci. 2020 Feb 17 (Online ahead of print).
4. Woolsey T.A., Van der Loos H., *The structural organization of layer IV in the somatosensory region (SI) of mouse cerebral cortex,* Brain Res. 17, 1970, s. 205-242.
5. Waite P.M., *Somatotopic organization of vibrissal responses in the ventro-basal complex of the rat thalamus,* J Physiol. 228, 1973, s. 527-540.
6. Rhoades R.W., Chiaia N.L., Mooney R.D., Klein B.G., Renehan W.E., Jacquin M.F., *Reorganization of the peripheral projections of the trigeminal ganglion following neonatal transection of the infraorbital nerve,* Somatosens Res. 5, 1987, s. 35-62.
7. Sugitani M., Yano J., Sugai T., Ooyama H., *Somatotopic organization and columnar structure of vibrissae representation in the rat ventrobasal complex,* Exp Brain Res. 81, 1990, s. 346-352.
8. 8. Simons D.J., Carvell G.E., *Thalamocortical response transformation in rat vibrissa/ barrel system,* J Neurophysiol. 61, 1989, s. 311-330.
9. Armstrong-James M., Callahan M., *Thalamo-cortical processing of vibrissal in formation in the rat. II. spatiotemporal convergence in the thalamic ventroposterior medial nucleus (VPM) and its relevance to generation of receptive fields of S1 cortical "barrel" neuron,* J Comp Neurol. 303, 1991, s. 211-224.

10. Chiaia N.L., Rhoades R.W., Bennett-Clarke C.A., Fish S.E., Killackey H.P., *Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei,* J Comp Neurol. 314, 1991, s. 201-216.
11. Simons D.J., *Response properties of vibrissa units in rat SI somatosensory neocortex,* J Neurophysiol. 41, 1978, s. 798-820.
12. Durham D., Woolsey T.A., *Barrels and columnar cortical organization: evidence from 2-deoxyglucose (2-DG) experiments,* Brain Res. 137, 1977, s. 168-174.
13. Hand P.J., *Plasticity of the rat barrel system,* [w:] Strick P.L., Morison A.R., ed. Changing Concepts of the Nervous System, New York: New York Academic Press 1982, s. 49-68.
14. Diamond M.E., Armstrong-James M., Budway M.J., Ebner F.F., *Somatic sensory responses in the rostral sector of the posterior group (POm) and in the ventral posterior medial nucleus (VPM) of the rat thalamus: dependence on the barrel field cortex,* J Comp Neurol. 319, 1992, s. 66-84.
15. Armstrong-James M., Fox K., *Spatio-temporal divergence and convergence in the rat SI "barrel" cortex,* J Comp Neurol. 263, 1987, s. 265-281.
16. Simons D.J., Land P.W., *Early experience of tactile stimulation influences organization of somatic sensory cortex,* Nature 326, 1987, s. 694-697.
17. Schubert D., Staiger J.F., Cho N., Kötter R., Zilles K., Luhmann H.J., *Layer specific intracolumnar and transcolumnar functional connectivity of layer V pyramidal cells in rat barrel cortex,* J Neurosci. 21, 2001, s. 3580-3592.
18. Konorski J., *Integracyjna działalność mózgu,* Warszawa PWN 1969.
19. Siucinska E., *Neurochemical correlates of functional plasticity in the mature cortex of the brain of rodents,* Behav Brain Res. 331, 2017, s. 102-114.
20. Siucinska E., Γ-*Aminobutyric acid in adult brain: an update,* Behav Brain Res. 376, 2019, 112224.
21. Kossut M., Stewart M.G., Siucinska E., Bourne R.C., Gabbott P., *Loss of ɣ-aminobutyric acid (GABA) immunoreactivity from mouse first somatosensory (SI) cortex following neonatal, but not adult denervation,* Brain Res. 538, 1991, s. 165-170.
22. Skangiel-Kramska J., Głazewski S., Jabłońska B., Siucińska E., Kossut M., *Reduction of $GABA_A$ receptor binding of [^{3}H]muscimol in the barrel field of mice after peripheral denervation: transcient and long-lasting effects,* Exp Brain Res. 100, 1994, s. 39-46.
23. Stewart M.G., Siucińska E., Kossut M., Davies H., *Loss of glutamate immunoreactivity from mouse first somatosensory (SI) cortex following neonatal vibrissal lesion,* Brain Res. 621, 1993, s. 331-338.
24. Głazewski S., Kossut M., Siucińska E., Skangiel-Kramska J., *Cholinergic markers in the plasticity of murine barrel field,* Acta Neurobiol Exp (Wars). 50, 1990, s. 163-172.
25. Skangiel-Kramska J., Głazewski S., Siucińska E., Kossut M., *Ontogenesis of muscarinic cholinergic receptor binding in the barrel cortex of mice,* Acta Neurobiol Exp (Wars). 52, 1992, s. 49.
26. Kossut M., Głazewski S., Siucińska E., Skangiel-Kramska J., *Functional plasticity and neurotransmitter receptor binding in the vibrissal barrel cortex,* Acta Neurobiol Exp (Wars). 53, 1993, s. 161-173.
27. Sokoloff L., Reivich M., Kennedy C., Des Rosiers M.H., Patlak C.S., Pettigrew K.D., Sakurada O., Shinohara M., *The [^{14}C] deoxyglucose method for the measurement of local cerebral glucose utilization: theory, procedure, and normal values in the conscious and anesthetized albino rat,* J Neurochem. 28, 1977, s. 897-916.
28. Siucińska E., Kossut M., *Short term changes of cortical body maps following partial vibrissectomy in adult mice,* Acta Neurobiol Exp (Wars). 54, 1994, s. 345-352.
29. Jabłońska B., Gierdalski M., Siucińska E., Kossut M., Skangiel-Kramska J., *Partial blocking of NMDA receptors restricts plastic changes in adult mouse barrel cortex,* Behav Brain Res. 66, 1995, s. 207-216.
30. Siucinska E, Kossut M., *Short-lasting classical conditioning induces reversible changes of representational maps of vibrissae in mouse SI cortex-a 2DG study,* Cerebral Cortex 6,

1996, s. 506-513.
31. Jabłońska B., Gierdalski M., Kossut M., Skangiel-Kramska J., *Partial blocking of NMDA receptors reduces plastic changes induced by short-lasting classical conditioning in the SI barrel cortex of adult mice,* Cerebral Cortex 9, 1999, s. 222-231.
32. Siucinska E., Kossut M., *Plasticity of mystacial fur representation in SI cortex of adult vibrissectomized rats – a 2DG study,* Neuroreport 5, 1994, s. 1605-1608.
33. Kim U., Ebner F.F., *Barrels and septa: separate circuits in rat barrel field cortex,* J Comp Neurol. 408, 1999, s. 489-505.
34. Siucinska E., Kossut M., Stewart M.G., *GABA immunoreactivity in mouse barrel field after aversive and appetitive classical conditioning training involving facial vibrissae,* Brain Res. 843, 1999, s. 62-70.
35. Urban-Ciećko J., Kossut M., Hess G., *Classical conditioning alters the short-term synaptic dynamics in mice barrel cortex,* Acta Neurobiol Exp. 65, 2005, s. 195-200.
36. Siucinska E., Kossut M., *Experience-dependent changes in cortical whisker representation in the adult mouse: A 2-Deoxyglucose study,* Neuroscience 127, 2004, s. 961-971.
37. Hoeflinger B.F., Bennet-Clarke C.A., Chiaia N.L., Killackey H.P., Rhoades R.W., *Patterning of local intracortical projections within the vibrissae representation of rat primary somatosensory cortex,* J Comp Neurol. 354, 1995, s. 551-563.
38. Kossut M., Juliano S.L., *Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissectomy in the barrel cortex of adult mice,* Neuroscience 92, 1999, s. 807-817.
39. Harris R.M., Woolsey T.A., *Computer-assisted analyses of barrel neuron axons and their putative synaptic contacts,* J Comp Neurol. 220, 1983, s. 63-79.
40. Lubke J., Egger V., Sakmann B., Feldmeyer D., *Columnar organization of dendrites and axons of single and synaptically coupled excitatory spiny neurons in layer IV of the rat barrel cortex,* J Neurosci. 20, 2000, s. 5300-5311.
41. Petersen C.C., Sakmann B., *Functionally independent columns of rat somatosensory barrel cortex revealed with voltage-sensitive dye imaging,* J Neurosci. 21, 2001, s. 8435-8446.
42. Petersen C.C., Sakmann B., *The excitatory neuronal network of rat layer IV barrel cortex,* J Neurosci. 20, 2000, s. 7579-7586.
43. Diamond M.E., Armstrong-James M., Ebner F.F., *Experience-dependent plasticity in adult rat barrel cortex,* Proc Natl Acad Sci USA. 90, 1993, s. 2082-2086.
44. Armstrong-James M., Diamond N.E., Ebner F.F., *An innocuous bias in whisker use in adult rats modifies receptive fields of barrel cortex neurons,* J Neurosci. 14, 1994, s. 6978-6991.
45. Diamond M., Huang W., Ebner F.F., *Laminar comparison of somatosensory cortical plasticity,* Science 265, 1994, s. 1885-1888.
46. Huang W., Armstrong-James M., Rema V., Diamond M.E., Ebner F.F., *Contribution of supragranular layers to sensory processing and plasticity in adult rat barrel cortex,* J Neurophysiol. 80, 1998, s. 3261-3271.
47. Meftah E.M., Rispal-Padel L., *Synaptic plasticity in the thalamo-cortical pathways as one of the neurological correlates of forelimb flexion conditioning: electrophysiological investigation in the cat,* J Neurophysiol. 72, 1994, s. 2631-2647.
48. Meftah E.M., Rispal-Padel L., *Reverse effects of conditioning produced by two different unconditioned stimuli on thalamocortical transmission,* J Neurophysiol. 77, 1997, s. 1663-1678.
49. Cruikshank S.J., Edeline J.M., Weinberger N.M., *Stimulation at a site of auditory-somatosensory convergence in the medial geniculate nucleus is an effective unconditioned stimulus for fear conditioning,* Behav Neurosci. 106, 1992, s. 471-483.
50. Edeline J.M., *The thalamo-cortical auditory receptive fields: regulation by the states of vigilance, learning and the neuromodulatory systems,* Exp Brain Res. 153, 2003 s. 554-72.

51. Bakin J.S., Weinberger N.M., *Classical conditioning induces CS-specific receptive field plasticity in the auditory cortex of the guinea pig,* Brain Res. 536, 1990, s. 271-286.
52. Erlander M.G., Tobin A.J., *The structural and functional heterogeneity of glutamic acid decarboxylase: A review,* Neurochem Res. 16, 1991, s. 215-226.
53. Asada H., Kawamura Y., Maruyama K., Kume H., Ding R., Ji F. Y., Kanbara N., Kuzume H., Sanbo M., Yagi T., Obata K., *Mice lacking the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase (GAD65) maintain normal levels of GAD67 and GABA in their brains but are susceptible to seizures,* Biochem Biophys Res Commun. 229, 1996, s. 891-895.
54. Kash S.F., Johnson R.S., Tecott L.H., Noebels J.L., Mayfield R.D., Hanahan D., Baekkeskov S., *Epilepsy in mice deficient in the 65-kDa isoform of glutamic acid decarboxylase,* Proc Natl Acad Sci USA. 94, 1997, s. 14060-14065.
55. Mercugliano M., Soghomonian J.J., Qin Y., Nguyen H.Q., Feldblum S., Erlander M.G., Tobin A.J., Chesselet M.F., *Comparative distribution of messenger RNAs encoding glutamic acid decarboxylases (Mr 65,000 and Mr 67,000) in the basal ganglia of the rat,* J Comp Neurol. 318, 1992, s. 245-254.
56. Kaufman D.L., Houser C.R., Tobin A.J., *Two forms of the γ-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions,* J Neurochem. 56, 1991, s. 720-723.
57. Namchuk M., Lindsay L., Turek C.W., Kanaani J., Baekkeskov S., *Phosphorylation of serine residues 3, 6, 10, and 13 distinguishes membrane anchored from soluble glutamic acid decarboxylase 65 and is restricted to glutamic acid decarboxylase 65 alpha,* J Biol Chem. 272, 1997, s. 1548-1557.
58. Hasu C.C., Thomas C., Chen W., Davis K.M., Foos T., Chen J.L., Wu E., Floor E., Schloss J.V., Wu J.Y., *Role of synaptic vesicle proton gradient and protein phosphorylation on ATP-mediated activation of membrane-associated brain glutamate decarboxylase,* J Biol Chem. 274, 1999, s. 24366-24371.
59. Martin D.L., Rimvall K., *Regulation of γ-aminobutyric acid synthesis in the brain,* J Neurochem. 60, 1993, s. 395-407.
60. Ding R., Asada H., Obata K., *Changes in extracellular glutamate and GABA levels in the hippocampal CA3 and CA1 areas and the induction of glutamic acid decarboxylase-67 in dentate granule cells of rats treated with kainic acid,* Brain Res. 800, 1998, s. 105-113.
61. Feldblum S., Erlander M.G., Tobin A.J., *Different distributions of GAD65 and GAD67 mRNAs suggest that the two glutamate decarboxylases play distinctive functional roles,* J Neurosci Res. 34, 1993, s. 689-706.
62. Johnston T.K., Chen D., Rickman C., Evans C., Brecha N.C., *Multiple gamma aminobutyric acid plasma membrane transporters (GAT-1, GAT-2, GAT-3) in the rat retina,* J Comp Neurol. 375, 1996, s. 212-224.
63. Cherubini E., Conti F., *Generating diversity at GABAergic synapses,* Trends Neurosci. 24, 2001, s. 155-162.
64. Scimemi A., *Structure, function, and plasticity of GABA transporters*, Front Cell Neurosci. 8, 2014, 161.
65. Bragina L., Marchionni I., Omrani A., Cozzi A., Pellegrini-Giampietro D.E., Cherubini E., Conti F., *GAT-1 regulates both tonic and phasic $GABA_A$ receptor-mediated inhibition in the cerebral cortex,* J Neurochem. 105, 2008, s. 1781-1793.
66. Conti F., Melone M., Fattorini G., Bragina L., Ciappelloni S., *A role for GAT-1 in presynaptic GABA homeostasis?,* Front Cell Neurosci. 5, 2011, 2.
67. Kinjo A., Koito T., Kawaguchi S., Inoue, K., *Evolutionary history of the GABA transporter (GAT) group revealed by marine invertebrate GAT-1,* PLoS One 8, 2013, e82410.
68. Siucinska, E., Hamed, A., Jasinska, M., *Increases in the Numerical Density of GAT-1 Positive Puncta in the Barrel Cortex of Adult Mice after Fear Conditioning,* PLoS One 9, 2014, e110493.
69. Savtchenko L., Megalogeni M., Rusakov D.A., Walker M.C., Pavlov I., *Synaptic GABA*

release prevents GABA transporter type-1 reversal during excessive network activity, Nat Commun. 6, 2015, 6597.
70. Zafar S., Jabeen I., *Structure, function and modulation of γ-aminobutyric, acid transporter 1 (GAT1) in neurological disorders: a pharmacoinformatic prospective,* Front Chem. 6, 2018, 397.
71. Lai C.T., Tanay V.A.M.I., Charrois G.J.R., Baker G.B., Bateson A.N., *Effects of phenelzine and imipramine on the steady-state levels of mRNAs that encode glutamic acid decarboxylase (GAD67 and GAD65), the GABA transporter GAT-1 and GABA transaminase in rat cortex,* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 357, 1998, s. 32-38.
72. Nägga K., Bogdanovic N., Marcusson J*., GABA transporters (GAT-1) in Alzheimer's disease,* J Neural Transm. 106, 1999, s. 1141-1149.
73. Pierri, J.N., Chaudry A.S., Woo T.U.W., Lewis D.A., *Alterations in chandelier neuron axon terminals in the prefrontal cortex of schizophrenic subjects,* Am J Psychiatry 156, 1999, s. 1709-1719.
74. Sundman-Eriksson I., Allard P., *[^{3}H] Tiagabine binding to GABAtransporter-1 (GAT-1) in suicidal depression,* J Affect Disord. 71, 2002, s. 29-33.
75. Conti F., Minelli A., Melone M*., GABA transporters in the mammalian cerebral cortex: localization, development and pathological implications,* Brain Res Rev. 45, 2004, s. 196-212.
76. Lewis D.A., Gonzalez-Burgos G., *Pathophysiologically basedtreatment interventions in schizophrenia,* Nat Med. 12, 2006, s. 1016-1022.
77. Cope D.W., Di Giovanni, G., Fyson S.J., Orbán G., Errington, A.C., Lôrincz, M. L., Goould T.M., Carter D.A. Crunelli V., *Enhanced tonic GABAA inhibition in typical absence epilepsy,* Nat Med. 15, 2009, s. 1392-1398.
78. Bitanihirwe B.K.Y., Woo, T.U.W., *Transcriptional dysregulation of γ-aminobutyric acid transporter in parvalbumin-containing inhibitory neurons in the prefrontal cortex in schizophrenia,* Psychiatry Res. 220, 2014, s. 1155-1159.
79. Carvill G.L., McMahon J.M., Schneider A., Zemel, M., Myers, C.T., Saykally, J., Nguyen J., Robbiano A., Zara F., Specchio N., Macarelli O., Smith R.L., Leventer R.J., Møller R.S., Nikanorova M., Dimova P., Jordanova A., Petrou S., EuroEPINOMICS Rare Epilepsy Syndrome Myoclonic-Astatic Epilepsy & Dravet working group, Helbig I., Striano P., Weckhuysen S., Berkovic S.F., Scheffer I.E., Mefford H.C*., Mutations in the GABA transporter SLC6A1 cause epilepsy with Myoclonic-Atonic Seizures,* Am J Hum Genet. 96, 2015, s. 808-815.
80. Gong X., Shao Y., Li B., Chen L., Wang C., Chen Y., γ*-aminobutyric acid transporter-1 is involved in anxiety-like behaviors and cognitive function in knockout mice,* Exp Ther Med. 10, 2015, s. 653-658.
81. Fuhrer T.E., Palpagama T.H., Waldvogel H.J., Synek B.J.L., Turner C., Faull R.L., Kwakowsky A., *Impaired expression of GABA transporters in the human Alzheimer's disease hippocampus, subiculum, entorhinal cortex and superior temporal gyrus,* Neuroscience 351, 2017, s. 108-118.
82. Mattison K.A., Butler K.M., Inglis G.A.S., Dayan O., Boussidan H., Bhambhani V., da Silva C., Alexander J.J., Kanner B.I., Escayg B.I*., SLC6A1 variants identified in epilepsy patients reduce γ-aminobutyric acid transport,* Epilepsia 59, 2018, e135-e141.
83. Barnard E.A., Skolnick P., Olsen R.W., Mohler H., Sieghart W., Biggio G., Braestrup C., Bateson A.N., Langer Z., *International Union of Pharmacology. XV. Subtypes of gamma-aminobutyric acidA receptors: classification on the basis of subunit structure and receptor function.* Pharmacol. Rev. 50, 1998, s. 291-313.
84. Fabri M., Manzoni T., *Glutamate decarboxylase immunoreactivity in cortical projecting neurons of rat somatic sensory cortex,* Neuroscience 72, 1996, s. 435-448.
85. Kubota Y., Mikawa S., Kawaguchi Y., *Neostriatal GABAergic interneurons contain NOS, calretinin or parvalbumin,* Neuroreport 5, 1993, s. 205-208.
86. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C.,

Interneurons of the neocortical inhibitory system, Nat Rev Neurosci. 10, 2004, s. 793-807.
87. Freund T., Katona I., *Perisomatic inhibition*, Neuron 56, 2007, s. 33-42.
88. Jones E.G., *GABAergic neurons and their role in cortical plasticity in primates,* Cerebral Cortex 3, 1993, s. 361-371.
89. Micheva K.D., Beaulieu C., *An anatomical substrate for experience dependent plasticity of the rat barrel field cortex,* Proc Natl Acad Sci USA. 92, 1995, s. 11834-11838.
90. Agmon A., Connors B.W., *Thalamocortical responses of mouse somatosensory (barrel) cortex in vitro,* Neuroscience 4, 1991, s. 365-379.
91. Barth A., *Differential plasticity in neocortical networks,* Physiol Behav. 77, 2002, s. 545-550.
92. Jabłońska B., Skangiel-Kramska J., *Sensory conditioning and sensory stimulation do not affect $GABA_A$ receptor binding in the barrel field of mice,* Acta Neurobiol Exp (Wars). 55, 1995, s. 289-293.
93. Ito M., *Long-term depression as a memory process in the cerebellum*, Neurosci Res. 3, 1986, s. 531-539.
94. Seitz R.J., Roland E., Bohm C., Greitz T., Stone-Elander S., *Motor learning in man: A positron emission tomographic study,* Neuroreport 1, 1990, s. 57-60.
95. Seitz R.J., Roland P.E., *Learning of sequential finger movements in man: A combined kinematic and positron emission tomography (PET) study,* Eur J Neurosci. 4, 1992, s. 154-165.
96. Nashner L.M., Grimm K.L., *Analysis of multiloop dyscontrols in standing cerebellar patients*, [w:] Desmond J.E. ed. Cerebral motor control in man: Long loop mechanisms. Karger: Basel 1978.
97. Weiner M.J., Hallett M., Funkenstein H., *Adaptation to lateral displacement of vision in patients with lesions of the central nervous system.* Neurology 33, 1983, s. 766-772.
98. Berthier N.E., Moore J.W., *Cerebellar Purkinje cell activity related to the classically conditioned nictitating membrane response*, Exp Brain Res., 63, 1986, s. 341-350.
99. Gilbert P.F.C., Thach W.T., *Purkinje cell activity during motor learning*, Brain Res. 128, 1977, s. 309-328.
100. Hesslow G., Ivarsson N., *Suppression of cerebellar, Purkinje cells during conditional responses in ferrets*, Neuroreport 5, 1994, s. 649-652.
101. Lin C.S., Lu S.M., Schmechel D.E., *Glutaminic-acid decarboxylase immunoreactivity in layer IV of barrel cortex of rat and mouse,* J Neurosci. 5, 1985, s. 1934-1939.
102. Chmielowska J., Stewart M.G., Bourne R.C., Hamori J., ɣ-Aminobutyric acid immunoreactivity in mouse barrel field: a light microscopical study, Brain Res. 368, 1986, s. 371-374.
103. Gierdalski M., Jabłonska B., Siucinska E., Lech, M., Skibinska A., Kossut M., *Rapid regulation of GAD67 mRNA and protein level in cortical neurons after sensory learning,* Cerebral Cortex 11, 2001, s. 806-815.
104. Ren J.Q., Aika Y., Heizmann C.W., Kosaka T., *Quantitative analysis of neurons and glial cells in the rat somatosensory cortex, with special reference to GABAergic neurons and parvalbumin-containing neurons,* Exp Brain Res. 92, 1992, s. 1-14.
105. Staiger J.F., Bayraktar T., Acsady L., Freund T.F., Zilles K*., Co-localization of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) and gamma aminobutyric acid (GABA) in rat cerebral cortex,* Eur J Neurosci. 8, 1995, s. 31-36.
106. Alcantra S., Soriano E., Ferrer I., *Thalamic and basal forebrain afferents modulate the development of parvalbumin and calbindin D28K immunoreactivity in the barrel cortex of the rat,* Eur J Neurosci. 7, 1996, s. 1522-1534.
107. Maier D.L., McCasland J.S., *Calcium-binding protein phenotype defines metabolically distinct groups of neurons in barrel cortex of behaving hamsters,* Exp Neurol. 145, 1997, s. 71-80.
108. Porter J.T., Johnson C.K., Agmon A., *Diverse types of interneurons generate thalamus-*

evoked feedforward inhibition in the mouse barrel cortex, J Neurosci. 21, 2001, s. 2699-2710.
109. Staiger J.F., Zilles K., Freund T.F., *Distribution of GABAergic elements postsynaptic to ventroposteromedial thalamic projections in layer IV of rat barrel cortex,* Eur J Neurosci. 11, 1996, s. 2273-2285.
110. Welker E., Soriano E., Dorfl J., Van der Loos H., *Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation,* Exp Brain Res. 78, 1989, s. 659-664.
111. Siucinska E., Kossut M., *Short-term sensory learning does not alter parvalbumin neurons in the barrel cortex of adult mice: A double-labeling study,* Neuroscience 138, 2006, s. 715-724.
112. Celio M.R., *Parvalbumin in most γ-aminobutyric acid-containing neurons of the rat cerebral cortex,* Science 231, 1986, s. 995-997.
113. Celio M.R., *Parvalbumin and calbindin in the rat nervous system,* Neuroscience 35, 1990, s. 375-475.
114. DeFelipe J., Gonzalez-Albo M.C., Del Rio M.R., Elston G.N., *Distribution and patterns of connectivity of interneurons containing calbindin, calretinin, and parvalbumin in visual areas of the occipital and temporal lobes of the macaque monkey,* J Comp Neurol. 412, 1999, s. 515-526.
115. Williams S.M., Goldman-Rakic P.S., Leranth C., *The synaptology of parvalbumin-immunoreactive neurons in the primate prefrontal cortex,* J Comp Neurol. 320, 1992, s. 353-369.
116. Kita H., Kossaka T., Heizmann C.W., *Parvalbumin-immunoreactive neurons in the rat: a light and electron microscopic study,* Brain Res. 536, 1990, s. 1-15.
117. Gibson J.R., Beierlein M., Connors B.W., *Two networks of electrically coupled inhibitory neurons in neocortex,* Nature 402, 1999, s. 75-79.
118. Galarreta M., Hestrin S., *Electrical and chemical synapses among parvalbumin fast spiking GABAergic interneurons in adult mouse neocortex,* Proc Natl Acad Sci USA. 99, 2002, s. 12438-12443.
119. Cybulska-Kłosowicz A., Posluszny A., Nowak K., Siucinska E., Kossut M., Liguz-Lecznar M., *Interneurons containing somatostatin are affected by learning-induced cortical plasticity,* Neuroscience 254, 2013, s.18-25.
120. Freund T.F., *Interneuron diversity series: rhythm and mood in perisomatic inhibition,* Trends Neurosci. 26, 2003, s. 489-495.
121. Xu X., Roby K.D., Edward M., Callaway E.M., *Immunochemical characterization of inhibitory mouse cortical neurons: Three chemically distinct classes of inhibitory cells,* J Comp Neurol. 31, 2010, s. 277-287.
122. Narkiewicz O., Moryś J., *Neuropeptydy,* [w:] Narkiewicz O., Moryś J., ed. Neuroanatomia czynnościowa i kliniczna. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa 2001, 2003, s. 347.
123. Hajos N., Katona I., Naiem S.S. MacKie K., Ledent C., Mody I., Freund F.T., *Cannabinoids inhibit hippocampal GABAergic transmission and network oscilations,* Eur J Neurosci. 12, 2000, s. 3239-3249.
124. Tsou W., Mackie K., Sanudo-Pana M.C., Walker J.M., *Cannabinoid CB1 receptors are localized primarily on cholecystokinin-containing GABAergic interneurons in the rat hippocampal formation,* Neuroscience 93, 1999, s. 969-975.
125. Siucinska, E., Brutkowski, W., Bernas, T., *CB1 Cannabinoid Receptor Expression in the Barrel Field Region Is Associated with Mouse Learning,* ACS Chem Neurosci. 9, 2018, s. 1304-1316.
126. Brosh I., Barkai E., *Learning – induced enhancement of feedback inhibitory synaptic transmission,* Learn Mem. 16, 2009, s. 413-416.
127. Wilson L.I., Nicoll R.A., *Endogenous cannabinoids mediate retrograde signalling at hippocampal synapses,* Nature 410, 2001, s. 588-592.
128. Wilson L.I., Nicoll R.A., *Endocannabinoid signaling in the brain,* Science 296, 2002,

s. 678-682.
129. Diana M.A., Marty A., *Endocannabinoid-mediated short-term synaptic plasticity: depolarization-induced suppression of inhibition (DSI) and depolarization-induced suppression of excitation (DSE),* Br J Pharmacol. 142, 2004, s. 9-19.
130. Sheinin A., Talani G., Davis M.I., Lovinger D.M., *Endocannabinoid – and mGluR5 – dependent short-term synaptic depression in an isolated neuron/bouton preparation from the hipppocampal CA1 region,* J Neurophysiol. 100, 2008, s. 1041-1052.
131. Low K., Crestani F., Keister R., Benke D., Bruning I., Benson J.A., Fritschy J.M., Rulicke T., Bluethmann H., Mohler H., Rudolph U., *Molecular and neuronal substrate for the selective attenuation of anxiety,* Science 290, 2000, s. 131-134.
132. Jonsson K.O., Holt S., Fowler C.J., *The endocannabinoid system: current pharmacological research and therapeutic possibilities,* Basic Clin Pharmacol Toxicol. 98, 2006, s. 124-134.
133. Cossart R., Bernard C., Ben-Ari Y., *Multiple facets of GABAergic neurons and synapses: multiple fates of GABA signaling in epilepsies,* Trends Neurosci. 28, 2005, s. 108-115.
134. Maglóczky Z., Freund T.F., *Impaired and repaired inhibitory circuits in the epileptic human hippocampus,* Trends Neurosci. 28, 2005, s. 334-340.
135. Ogiwara I., Miyamoto H., Morita N., Atapour N., Mazaki E., Inoue I., Takeuchi T., Itohara S., Yanagawa Y., Obata K., Furuichi T. Hensch T., Yamakawa K., *Nav1.1 localizes to axons of parvalbumin-positive inhibitory interneurons: a circuit basis for epileptic seizures in mice carrying an Scn1a gene mutation,* J Neurosci. 27, 2007, s. 5903-5914.
136. Monory K., Massa F., Egertova M., Eder M., Blaudzun H., Westenbroek R., Kelsch W., Jakob W., Marsch R., Ekker M., Long J., Rubenstein J.L., Goebbels S., Nave K-A. During M., Klugmann M., Wölfel B., Dodt H-U., Zieglgänsberger, Wojtak C.T., Mackie K., Elphick M.R. Marsicano G., Lutz B., *The endocannabinoid system controls key epileptogenic circuits in the hippocampus,* Neuron 51, 2006, s. 455-466.
137. Siucinska E., *GAD67-positive puncta: contributors to learning-dependent plasticity in the barrel cortex of adult mice,* Brain Res. 1106, 2006, s. 52-62.
138. Lech M., Skibinska A., Siucinska E., Kossut M., *Learning-induced plasticity of cortical representations does not affect GAD65 mRNA expression and immunolabeling of cortical neuropil,* Brain Res. 1044, 2005, s. 266-271.
139. Stewart M.G., Csillag A., Rose S.P., *Alterations in synaptic structure in the paleostriatal complex of the domestic chick, Gallus domesticus, following passive avoidance training,* Brain Res. 426, 1987, s. 69-81.
140. Patel S.N., Rose S., Stewart M.G., *Training induced dendritic spine density changes are specifically related to memory formation processes in the chick, Gallus domesticus,* Brain Res. 463, 1988, s. 168-173.
141. Jasinska, M., Siucinska, E., Cybulska-Klosowicz, A., Pyza, E., Furness, D. N., Kossut, M., Glazewski, S., *Rapid, learning-induced inhibitory synaptogenesis in murine barrel field,* J Neurosci. 30, 2010, s. 1176-1184.
142. Allen N.J., Bennett M.L., Foo L.C., Wang G.X., Chakraborty C., Smith S.J., Barres B.A., *Astrocyte glypicans 4 and 6 promote formation of excitatory synapses via Glu A1 AMPA receptors,* Nature 486, 2012, s. 410-414.
143. Allen N.J., Eroglu C., *Cell Biology of astrocyte-synapse interactions,* Neuron 96, 2017, s. 697-708.
144. Blanco-Suarez E., Liu T-F., Kopelevich A., Allen N.J., *Astrocyte-secreted chordin-like 1 drives synapse maturation and limits plasticity by increasing synaptic GluA2 AMPA Receptors,* Neuron 100, 2018, s. 1116-1132.
145. Paredes D.A., Cartford M.C., Catlow B.J., Samec A., Avilas M., George A., Schlunck A., Small B., Bickford P.C., *Neurotransmitter release during delay eyeblink classical conditioning: Role of norepinephrine in consolidation and effect of age,* Neurobiol Learn Mem. 92, 2009, s. 267-282.
146. Venton B.J., Robinson T.E., Kennedy R.T., Maren S., *Dynamic amino acid increases*

in the basolateral amygdale during acquisition and expression of conditioned fear, Eur J Neurosci. 23, 2006, s. 3391-3398.
147. Knott G.W., Quairiaux C., Genoud C., Welker E., *Formation of dendritic spines with GABAergic synapses induced by whisker stimulation in adult mice,* Neuron 34, 2002, s. 265-273.
148. Bear M.F., Singer W., *Modulation of visual cortical plasticity by acetylcholine and noradrenaline,* Nature 320, 1986, s. 172-176.
149. Kilgard M.P., Merzenich M.M., *Cortical map reorganization enabled by nucleus basalis activity,* Science 279, 1998, s. 1714-1718.
150. Sara S.J., *Learning by neurones: role of attention, reinforcement and behaviour,* C R Acad Sci III. 321, 1998, s. 193-198.
151. Sarnyai Z., Sibille E.L., Pavlides C., Fenster R.J., McEwen B.S., Toth M., *Impaired hippocampal-dependent learning and functional abnormalities in the hippocampus in mice lacking serotonin (1A) receptors,* Proc Natl Acad Sci USA. 97, 2000, s. 14731-14736.
152. Levin B.E., Craik R.L., Hand P.J., *The role of norepinephrine in adult rat somatosensory (SmI) cortical metabolism and plasticity,* Brain Res. 443, 1988, s. 261-71.
153. Schultz W., *Behavioral theories and the neurophysiology of reward,* Annu Rev Psychol. 57, 2006, s. 87-115.
154. Bao S., Chan V.T., Merzenich M.M., *Cortical remodelling induced by activity of ventral tegmental dopamine neurons,* Nature 412, 2001, s. 79-83.
155. Kojic L., Gu Q., Douglas R.M., Cynader M.S., *Laminar distribution of cholinergic-and serotonergic-dependent plasticity within kitten visual cortex,* Brain Res Dev Brain Res. 126, 2001, s. 157-162.
156. Lane R.D., Rizk T., Chiaja N.L., Mooney R.D., Rhoades R.W., *Effects of alterations of the vibrissae-related organization of thalamocortical axons upon the organization and outgrowth of intracortical connections in the barrel field of the rat,* Somatosens Mot Res. 19, 2002, s. 125-129.
157. Dykes R.W., *Mechanisms controlling neuronal plasticity in somatosensory cortex,* Can J Physiol Pharmacol. 75, 1997, s. 535-545.
158. Lu S.M., Lin R.S., *Thalamic afferents of the rat barrel cortex: a light and electron-microscopic study using Phaseolus vulgaris leucoaglutinin as an anterograde tracer,* Somatosens Mot Res. 10, 1993, s. 1-16.
159. Killackey H.P., Sherman S.M., *Corticothalamic projections from the rat primary somatosensory cortex,* J Neurosci. 23, 2003, s. 7381-7384.
160. Salin P.A., Prince D.A., *Spontaneous GABAA receptor-mediated inhibitory currents in adult rat somatosensory cortex,* J Neurophysiol. 75, 1996, s. 1573-1588.
161. Aroniadou-Anderjaska V., Keller A., *Intrinsic inhibitory pathways in mouse barrel cortex,* Neuroreport 7, 1996, s. 2363-2368.
162. Galarreta M., Hestrin S., *A network of fast-spiking cells in the neocortex connected by electrical synapses,* Nature 402, 1999, s. 75-79.
163. McCasland J.S., Hibbard L.S., *GABAergic neurons in barrel cortex show strong, whisker-dependent metabolic activation during normal behavior,* J Neurosci. 17, 1997, s. 5504-5527.
164. Fernández de Sewilla D., Núñez A., Bruño W., *Muscarinic receptors, from synaptic plasticity to its role in network activity,* Neuroscience Epub. Apr 8, 2020.
165. Wang Y., Toledo-Rodriguez M., Gupta A., Wu C., Luo J., Silberberg G., Markram H., *Anatomical, physiological and molecular properties of Martinotti Cells in the somatosensory cortex of the juvenile rat,* J Physiol. 561, 2004, s. 65-90.
166. Keller A., White E.L., Cipolloni P.B., *The identification of thalamocortical axon terminals in barrels of mouse SmI cortex using immunocytochemistry of anterogradely transported lectin (Phaseolus vulgaris – leucoaglutinin),* Brain Res. 343, 1985, s. 159-165.
167. Keller A., White E.L., *Synaptic organization of GABAergic neurons in the mouse Sm I cortex,* J Comp Neurol. 262, 1987, s. 1-12.

168. Luhman H.J., Prince D.A., *Control of NMDA receptor mediated activity by GABAergic mechanisms in mature and developing rat neocortex,* Dev Brain Res. 54, 1990, s. 287-290.
169. Skibińska A., Lech M., Kossut M*., PSD95 protein level rises in murine somatosensory cortex after sensory training,* Neuroreport 12, 2001, s. 2907-2910.
170. Le Mageresse C., Monyer H., *GABAergic interneurons shape the functional maturation of the cortex,* Neuron 77, 2013, s. 388-405.
171. Vickers E.D., Clark C., Osypenko D., Fratzi A., Kochubey O., Bettler B., Schneggenburer R*., Parvalbuminin – interneuron output synapses show spike-timing-dependent plasticity that contributes to auditory map remodeling,* Neuron 99, 2018, s. 720-735.
172. Jasinska M., Siucinska E., Jasek E., Litwin J.A., Pyza E., Kossut M., *Fear learning increases the number of polyribosomes associated with excitatory and inhibitory synapses in the barrel cortex,* PLoS One 8, 2013, e54301.
173. Siucinska E., Hamed A., *Fear conditioning affect the expression of cholecystokinin interneurons in the primary somatosensory cortex of adult mice,* [w:] Albrecht J., Pilc A. ed. Conferences on amino-acidergic transmission. Glutamate/GABA and Neuro-Glia-vascular interplay in norm and pathology, Kraków, 2014, s. 94.

Plastyczność mózgu na przykładzie kory baryłkowej myszy

Streszczenie
Wiele danych neurobiologicznych wskazuje, że osłabienie/wzmocnienie informacji sensorycznej przekazywanej do struktur czuciowych u ssaków wywołuje zmiany strukturalne i funkcjonalne w odpowiadających im obszarach korowych. W pracy zjawiska plastyczności pierwszorzędowej kory somatosensorycznej (S1) tzw. kory baryłkowej dorosłych myszy są ilustrowane danymi uzyskanymi z wykorzystaniem modeli doświadczalnych, a także wynikami własnych badań reprezentacji wibryss czuciowych podanej deprywacji, deaferentacji sensorycznej oraz warunkowaniu klasycznemu ze wzmocnieniem awersyjnym i apetytywnym. Wyniki omawiają: odpowiedzi anatomiczne, elektrofizjologiczne, autoradiografię receptorów, zmiany w gęstości korowych neuronów GABAergicznych, GAD na poziomie mRNA i białka głównego enzymu syntetyzującego GABA, zmiany w ekspresji punktów transportera GAT-1, receptora CB1 oraz inhibicyjna synaptogenezę w korowej reprezentacji odpowiadającego rzędu wibryss.
Słowa kluczowe: plastyczność, kora somatosensoryczna, markery GABAergiczne, wibryssy, dorosłe myszy

Brain plasticity on the example of the barrel cortex of mice

Abstract
Many of studies in the neurobiology and own results indicate that decrease/increase of input to sensory structures in mammals is known to produce marked changes in cortical recipient areas. This paper reviews plasticity of mystacial vibrissae (whiskers) representation in primary somatosensory cortex (S1) of adult mouse caused by deprivation, deafferentation, and aversive/appetitive classical conditioning training involving stimulation of row of mystacial vibrissae. These include: anatomical, electrophysiological responses, receptor autoradiography, changes in density γ-aminobutyric acid (GABA) neurons, GAD at mRNA and protein levels-the synthesizing enzyme for the neurotransmitter GABA, expression of transporter GAT-1 puncta, CB1 puncta and inhibitory synaptogenesis in cortical representation of recipient the rows of vibrissae.
Keywords: plasticity, somatosensory cortex, GABAergic markers, whiskers, adult mouse

Magdalena Stobiecka[1], Joanna Wajs[2]

Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych pod względem kwasowości i zawartości tłuszczu

1. Wstęp

W ostatnich latach świadomość konsumentów dotycząca zakupów i spożycia mlecznych produktów fermentowanych wzrosła. Mleczne napoje fermentowane są powszechnie dostępne w sprzedaży. Obecnie na rynku można spotkać szereg produktów z tej grupy, począwszy od jogurtów czy kefirów po produkty ukwaszone czy produkty mleczne nowej generacji. Mleczne produkty fermentowane zostały zdefiniowane przez Organizację ds. Wyżywienia i Rolnictwa (FAO), Światową Organizację Zdrowia (WHO) oraz Międzynarodową Federację Mleczarską (IDF) jako produkty otrzymywane „z mleka pełnego, częściowo lub całkowicie odtłuszczonego, zagęszczonego lub regenerowanego w proszku", które poddawane są procesom fermentacji z udziałem mikroorganizmów. Najbardziej znanym napojem fermentowanym w dzisiejszych czasach jest jogurt. Definicja przyjęta przez FAO/WHO mówi, że jogurt jest fermentowanym produktem mlecznym, który uzyskuje się przez ukwaszenie mleka bakteriami jogurtowymi, tj. *Lactobacillus delbruecckii* ssp. *bulgaricus* i *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus*. Powinien zawierać co najmniej 107 żywych bakterii w 1 cm^3 [8, 18].

Obecnie jogurt jest jednym z najczęściej spożywanych mlecznych napojów fermentowanych. Konsumenci cenią jogurty za ich walory smakowe, a także za ich szczególną wartość odżywczą i prozdrowotny wpływ na organizm [2, 17, 22]. Rocznie spożycie jogurtów czy kefirów szacuje się na 7-8 kg·osobę$^{-1}$. Nabywcy coraz częściej zwracają uwagę na jakość, wartość odżywczą czy energetyczną produktów mlecznych. W dzisiejszych czasach znaczna część konsumentów wybiera takie produkty, które zawierają obniżoną zawartość tłuszczu.

W nomenklaturze wyróżniamy cztery podtypy produktów mlecznych nowej generacji:

- I generacja – do tej grupy zaliczamy między innymi zsiadłe mleko. Fermentacja jest przeprowadzona spontanicznie przez bakterie *Streptococcus salivarius* ssp. *thermophilus* i *Lactobacillus delbruecckii* ssp. *bulgaricus;*
- II generacja – do tej grupy należą miedzy innymi kefir, jogurty, do których najczęściej dodaje się bakterie *Lactobacillus acidophilus* oraz bakterie z rodzaju *Bifidobacterium*;
- III generacja produkty powstają w oparciu o procesy fermentacyjne probiotyków. Wykorzystuje się tutaj bakterie jelitowe tj., *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus casei*. W tej grupy produktów wyróżnić można napoje mleczne i lody wzbogacone kulturą probiotyków, które dodawane są do schłodzonego mleka (4°C), następnie utrzymywane w takiej, bądź niższej temperaturze;

[1] Magdalena.Stobiecka@student.up.edu.pl, Instytut Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.
[2] joanna.wajs@up.lublin.pl, Instytut Oceny Jakości i Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Nauk o Zwierzętach i Biogospodarki, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie.

• IV generacja – możemy tutaj wyróżnić biojogurty, charakteryzujące się dodatkiem szczepów o potwierdzonych korzystnych cechach. Ponadto nadają jogurtom dodatkowej wartości zdrowotnej [13].

Mleczne napoje fermentowane charakteryzują się lekko kwaśnym smakiem oraz łagodnym, przyjemnym zapachem. Aby poprawić smakowitość tych produktów, producenci często wzbogacają je poprzez dosładzanie, dodawanie owoców, bakalii, aromatów oraz zwiększenie suchej masy mleka [7]. Według wymagań WHO aby napój mógł być zaliczany do produktów mlecznych fermentowanych jego kwasowość miareczkowa nie może być niższa niż 0,6% kwasu mlekowego [19].

Warto zaznaczyć, że surowcem do produkcji jogurtów jest głównie mleko krowie. Jednakże w dzisiejszych czasach producenci wytwarzają także mleczne napoje fermentowane na bazie mleka koziego czy owczego [12, 13]. W tabeli 1 przedstawiono procentowy skład jogurtów, w zależności od gatunku zwierząt, od których pozyskano mleko, a następnie wykorzystano, jako surowiec w procesie produkcji mlecznych napojów fermentowanych.

Tabela 1. Skład chemiczny jogurtów produkowanych z mleka różnych gatunków zwierząt

Jogurt z mleka	Sucha masa [%]	Tłuszcz [%]	Białko [%]	Laktoza [%]
Krowiego	14-16	2	4,3	4,6
Koziego	14	4,1	4	4,4
Owczego	15-21	4,8-8	4,5	5,1
Bawolego	17,4	6,5	4,3	4,9

Źródło: [1, 5, 7]

2. Właściwości prozdrowotne jogurtów

Jogurty stanowią cenne źródło składników odżywczych. W swoim składzie zawierają pełnowartościowe białka, a także dobrze przyswajalne składniki mineralne, takie jak wapń, potas czy fosfor. Warto zwrócić uwagę, że jogurty są łatwiej wchłaniane niż mleko, m.in. ze względu na zawartość laktozy, która jest częściowo lub całkowicie rozkładana na cukry proste. Z tego powodu osoby nietolerujące laktozy mogą spożywać ten produkt i nie obawiać się o skutki uboczne. Fermentowane napoje mleczne pobudzają układ trawienny i zwiększają apetyt. Największą zaletą spożywania jogurtów jest ich prozdrowotny wpływ na mikroflorę jelit. Bakterie zawarte w jogurtach suplementują naturalną mikroflorę jelit, stabilizują ich funkcjonowanie, regulują wiele zaburzeń trawiennych oraz wpływają na naturalny stosunek liczby bakterii pożądanych i niepożądanych [21]. Uznaje się, że udział bakterii pożądanych do bakterii niepożądanych powinien wynosić 85% do 15%. Powszechnie u wielu ludzi występują wahania tych proporcji, ponieważ właściwy stan może być zakłócony przez wiele czynników, takich jak zatrucia pokarmowe, zaburzenia trawienne (biegunki), infekcje, stosowanie antybiotyków oraz innych leków czy stres. Aby przywrócić poprawny stan mikrobioty jelitowej, należy spożywać fermentowane napoje mleczne. Dodatkową zaletą jest zawartość substancji, które wykazują właściwości antybakteryjne, co znacząco wpływa na obniżenie rozwoju i aktywności bakterii gnilnych oraz chorobotwórczych, jak np. z rodzaju *Salmonella*, *Shigella* czy *Escherichia coli* [9].

3. Charakterystyka tłuszczu mlekowego

Podstawowym źródłem energii dla człowieka są zawarte w żywności tłuszcze (9 kcal·g^{-1}) oraz węglowodany (4 kcal·g^{-1}). Jogurty naturalne zawierają przeciętnie 0,8-3% tłuszczu, 3,4-4,8% białka i 3,8-11,8% węglowodanów [6]. Charakterystyczną cechą tłuszczu mlekowego jest duże zróżnicowanie składu kwasów tłuszczowych, w tym wysoka zawartość krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych. Niektóre kwasy tłuszczowe tłuszczu mlekowego wykazują działanie prozdrowotne, korzystnie wpływając na zdrowie człowieka. Kwas masłowy charakteryzuje się właściwościami przeciwnowotworowymi, a oleinowy wykazuje działanie przeciwmiażdżycowe. Wielokierunkowe działanie prozdrowotne, m.in. przeciwnowotworowe i przeciwmiażdżycowe wykazuje sprzężony kwas linolowy (CLA) [14]. Ilość CLA w mleku zazwyczaj waha się od 2 do aż 37 mg·g^{-1} tłuszczu. Mleko i jego przetwory są bogatym źródłem kwasu cis9trans11 C18:2 w diecie człowieka. Na poziom CLA w produktach mleczarskich, tj. serach czy napojach fermentowanych, poza żywieniem zwierząt, a więc koncentracją CLA w surowcu, mogą wpływać także warunki panujące podczas prowadzenia procesów technologicznych oraz aktywność dodawanych kultur bakterii fermentacji mlekowej. Najlepszym ich źródłem są wysokotłuszczowe artykuły mleczne tj. sery dojrzewające czy masło, jednakże nie zmienia to faktu, iż są one obecne również w innych produktach. W przypadku jogurtów ich średnia zawartość mieści się w granicach 3,8-8,8 mg·g^{-1} tłuszczu, a w jogurtach niskotłuszczowych utrzymuje się na poziomie 4,4 mg·g^{-1} tłuszczu. Warto wspomnieć, że pasteryzacja stosowana w trakcie produkcji jogurtów nie wpływa na zawartość CLA w produkcie końcowym – tabela 2 [3, 14].

Tabela 2. Średnia zawartość wszystkich izomerów CLA (mg·g-1 tłuszczu) oraz izomeru cis9trans11 (%) w produktach mlecznych

Produkt	CLA	CIS-9, TRANS-11
Mleko pełne	3,4-6,8	8,2-97
Mleko 2%	4,1	brak danych
Ser cheddar	3,6	92
Jogurt	3,8-8,8	83-84
Jogurt niskotłuszczowy	4,4	86
Śmietana	4,6-7,5	78-90
Masło	4,7-9,4	78-88

Źródło: [3]

4. Cel pracy

Celem badań była ocena kwasowości oraz zawartości tłuszczu w jogurtach dostępnych na rynku w odniesieniu do wymagań jakościowych dla mleka fermentowanego według Polskiej Normy PN-A-86061:2002.

5. Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły jogurty naturalne i wysokobiałkowe ze zróżnicowaną zawartością tłuszczu, zakupione na rynku lubelskim. Zgodnie z deklaracją producenta zawartość tłuszczu była zróżnicowana i wynosiła od 0% do 9%. Ocenie poddano 13 jogurtów, których charakterystykę przedstawiono w tabeli 3. Analizy wykonano w dwóch powtórzeniach.

Tabela 3. Charakterystyka jogurtów zakupionych na rynku lubelskim

Nr	Jogurt	Zawartość tłuszczu (%) w 100 g produktu
1	Jogurt naturalny (bez GMO)	3,1
2	Jogurt naturalny	3,4
3	Jogurt naturalny typu islandzkiego	0,0
4	Bioekologiczny jogurt naturalny	4,2
5	Jogurt naturalny (zawiera wysoką zawartość Ca)	2,0
6	Jogurt śmietankowy	9,0
7	Jogurt proteinowy kawowy	0,7
8	Jogurt proteinowy (wysoka zawartość białka)	0,0
9	Jogurt naturalny (nie zawiera mleka w proszku)	2,0
10	Jogurt naturalny (wysoka zawartość białka)	2,0
11	Jogurt naturalny lekki	0,0
12	Jogurt naturalny 0% tłuszczu	0,0
13	Jogurt naturalny wysokobiałkowy	0,0

Źródło: Opracowanie własne

W jogurtach oznaczono:

• wartość pH, przy pomocy pH-metru (Elmetron CP-401, Polska);

• kwasowość potencjalną (°SH) metodą miareczkową. Oznaczenie kwasowości ogólnej polegało na miareczkowaniu 25 cm^3 jogurtu roztworem wodorotlenku sodowego 0,25N wobec fenoloftaleiny (2% roztwór alkoholowy), według PN-A-86061:2002. Oznaczenie polegało na dodaniu 2 cm^3 fenoloftaleiny i miareczkowaniu roztworem wodorotlenku sodowego do otrzymania lekko różowego zabarwienia utrzymującego się przez 30 s. Podstawą do obliczenia kwasowości w stopniach Soxhlet-Henkla (°SH) w analizowanych próbkach jogurtów była objętość 0,25N roztworu wodorotlenku sodowego zużytego w miareczkowaniu (cm^3) przemnożona przez współczynnik 4. Kwasowość miareczkową przeliczono na zawartość kwasu mlekowego (1°SH = 0,0225 kwasu mlekowego) [15];

• zawartość tłuszczu metodą Gerbera według PN-75/A-86130. Zasada oznaczenia polegała na rozpuszczeniu białka w kasie siarkowym, wydzieleniu tłuszczu przez wirowanie i określeniu jego zawartości. Do kolby pomiarowej odważono 45,0 g napoju z dokładnością do 0,01 g, następnie uzupełniono do kreski roztworem amoniaku. Pozostawiono na 30-40 minut do rozpuszczenia. Często mieszkano. Po tym czasie do tłuszczomierza odmierzono 10 cm^3 kwasu siarkowego i 11cm^3 rozcieńczonej próbki napoju mlecznego, wlewając ostrożnie po ściankach tłuszczomierza. Następnie dodano 1 cm^3 alkoholu izoamylowego. Tłuszczomierz zakorkowano i po dokładnym wymieszaniu zawartości przez odwracanie tłuszczomierza wstawiono do łaźni wodnej o temperaturze 65±2°C na około 15 minut. W czasie ogrzewania mieszano od czasu do czasu do momentu całkowitego rozpuszczenia białka. Tłuszczomierz wyjęto z łaźni wodnej i wirowano w wirówce przez 5 minut. Po odwirowaniu tłuszczomierze umieszczono w łaźni wodnej o temperaturze 65±2°C na około 5 minut [16].

Uzyskane wyniki opracowano statystycznie przy wykorzystaniu programu StatSoft Inc. Statistica ver. 13.1 (Statsoft Inc., 2016). Badania wykonano w dwóch powtórzeniach.

6. Omówienie wyników

W tabeli 4 przedstawiono wyniki z kwasowości ocenianych jogurtów naturalnych. Według Polskiej Normy kwasowość miareczkowa mlecznych produktów fermentowanych powinna wynosić nie mniej niż 26,67°SH (nie mniej niż 0,6% kwasu mlekowego) [15]. Natomiast kwasowość czynna jogurtu powinna mieścić się w przedziale pH od 4,0 do 4,5 [13, 15]. Kwasowość potencjalna badanych jogurtów naturalnych pozostawała na poziomie od 36,6 do 48,50°SH, natomiast pH wynosiło od 4,2 do 4,5. Mojka w przebadanych jogurtach naturalnych otrzymała również wyniki w granicach 36-48°SH, a pH między 4,4-4,6 [13]. Podobne wyniki uzyskano również podczas kontroli, przeprowadzonej przez Inspekcję Handlową. Kwasowość ocenianych przez Inspekcję Handlową jogurtów naturalnych mieściła się w zakresie 36-53oSH, czyli spełniała wymagania normy [10, 11].

Tabela 4. Kwasowość ocenianych jogurtów zakupionych na rynku lubelskim

Produkt	Kwasowość		
	pH	°SH	ilość kwasu mlekowego [%]
Jogurt naturalny (bez GMO)	4,39±0,01	45,80±0,40	1,03±0,40
Jogurt naturalny	4,40±0,01	38,10±0,10	0,86±0,10
Jogurt naturalny typu islandzkiego	4,36±0,01	37,24±0,20	0,84±0,20
Bioekologiczny jogurt naturalny	4,30±0,01	36,60±0,10	0,73±0,10
Jogurt naturalny (zawiera wysoką zawartość Ca)	4,44±0,01	42,10±0,30	0,95±0,30
Jogurt śmietankowy	4,42±0,01	33,50±0,40	0,75±0,40
Jogurt proteinowy kawowy	4,40±0,01	47,00±0,40	1,06±0,40
Jogurt proteinowy (wysoka zawartość białka)	4,30±0,02	47,00±0,40	1,06±0,40
Jogurt naturalny (nie zawiera mleka w proszku)	4,20±0,03	42,40±0,70	0,95±0,70
Jogurt naturalny (wysoka zawartość białka)	4,23±0,01	39,60±0,40	0,89±0,40
Jogurt naturalny lekki	4,32±0,01	41,40±0,30	0,93±0,30
Jogurt naturalny 0% tłuszczu	4,41±0,01	48,50±0,30	1,09±0,30
Jogurt naturalny wysokobiałkowy	4,48±0,03	46,00±0,50	1,04±0,50

Źródło: Opracowanie własne

Zawartość tłuszczu w ocenianych jogurtach naturalnych kształtowała się od 0,0 do 9,0%, przy czym należy zaznaczyć, iż w 70% próbek była zgodna z deklaracją producenta – tabela 5. W przypadku pięciu prób wyniki były zaniżone (odpowiednio o 0,1%, 0,2 i 0,25%). Badania przeprowadzone przez

Sosnowską i Kurek odnośnie deklarowanej ilości tłuszczu w badanych produktach pokazują, że w przypadku dwóch jogurtów zawartość badanego parametru była równa z deklaracją na opakowaniu. Autorki w większości badanych produktów uzyskały wyniki wyższe od podanych na opakowaniu (od 0,1 do 0,4%), zaś w dwóch przypadkach – niższą (odpowiednio o 0,2% i 0,4%) [20]. Różnica w zawartości tłuszczu oznaczonej i deklarowanej przez producenta jest częstą wadą mlecznych napojów fermentowanych. Inspekcja Handlowa podczas kontroli jogurtów naturalnych wykazała, że 50% badanych produktów miało wyższą (od 0,06 do 0,7%) zawartość tłuszczu w stosunku do deklarowanej [10,11]. Zawyżona zawartość tłuszczu może wskazywać na niewłaściwe przygotowanie surowca w trakcie produkcji, natomiast zaniżona – na fałszowanie produktu, poprzez zastępowanie droższego składnika żywności (tłuszczu mlecznego) – tańszym np. wodą.

Tabela 5. Zawartości tłuszczu (deklarowana przez producenta na etykiecie i oznaczona w badaniach) w ocenianych jogurtach zakupionych na rynku lubelskim

Produkt	Zawartość tłuszczu [%]	
	deklarowana	oznaczona
Jogurt naturalny (bez GMO)	3,1	3,05±0,1
Jogurt naturalny	3,4	3,30±0,1
Jogurt naturalny typu islandzkiego	0,0	0,00
Bioekologiczny jogurt naturalny	4,2	3,95±0,1
Jogurt naturalny (zawiera wysoką zawartość Ca)	2,0	1,80±0,1
Jogurt śmietankowy	9,0	9,00±0,4
Jogurt proteinowy kawowy	0,7	0,6±0,1
Jogurt proteinowy (wysoka zawartość białka)	0,0	0,00
Jogurt naturalny (nie zawiera mleka w proszku)	2,0	2,05±0,2
Jogurt naturalny (wysoka zawartość białka)	2,0	1,80±0,1
Jogurt naturalny lekki	0,0	0,00
Jogurt naturalny 0% tłuszczu	0,0	0,05±0,1
Jogurt naturalny wysokobiałkowy	0,0	0,05±0,1

Źródło: Opracowanie własne

7. Wnioski/Podsumowanie

Kwasowość ocenianych jogurtów naturalnych wyrażona ilością kwasu mlekowego była zgodna z wymaganiami Polskiej Normy, tj. jogurty zawierały powyżej 0,6% kwasu mlekowego. Większość prób (70%) spełniała również wymagania odnośnie zawartości tłuszczu, tj. oznaczona ilość tłuszczu była zgodna z podaną na etykiecie. W pozostałych próbach wykazano zaniżoną zawartość tłuszczu w stosunku do deklarowanej, co może świadczyć o nieprawidłowościach na etapie normalizacji, bądź zaburzeniach podczas procesu produkcyjnego poprzez dodatek wody lub innych składników, które prowadzą do zmian składu chemicznego jogurtów.

Literatura:

1. Bano P., Abdullah M., Nadeem M., Babar M.E., Khan G.A., *Preparation of functional yoghurt from sheep and goat milk blends*, Pakistan Journal of Agricultural Sciences, 48(3), 2011, s. 211-215.
2. Brodziak A., Król J., *Mleczne napoje fermentowane właściwości prozdrowotne,* Przemysł Spożywczy, 10, 2016, s. 22-28.
3. Cichosz G., Czeczot H., *Tłuszcz mlekowy w profilaktyce chorób dietozależnych*, Bromatoloigia i chemia toksykologiczna, 1, 2014, s. 1-9.
4. Czapski J., Górecka D., *Żywność prozdrowotna – składniki i technologia*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2015, s. 249-253.
5. Danków R., Pikul J., *Przydatność technologiczna mleka owczego do przetwórstwa*, Nauka. Przyroda. Technologie, 2, 2011, s. 1-19.
6. Derewiak D., Sobiecka A., Ciecierska M., Drużyńska B., Majewska E., Kowalska J., *Charakterystyka wybranej żywności o obniżonej kaloryczności*, Postępy Techniki Przetwórstwa Spożywczego, 2(23), 2013, s. 70-74.
7. Dołhańczuk-Śródka A., Nabrdalik M., Maślak N., Wąsiewicz N., Ziembik Z., *Właściwości reologiczne jogurtów naturalnych*, Proceedings of ECOpole, 1, 2015, s. 193-200.
8. FAO/WHO (2003) CODEX Standard for Fermented Milks. Codex Stan 243-2003. Reviewed 2008, 2010.
9. Flaczyk E., Górecka D., Korczak J., *Towaroznawstwo żywności pochodzenia zwierzęcego*, Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, 2011, s. 102-105.
10. *IJHARS o wynikach kontroli planowanej w zakresie jakości handlowej przetworów mlecznych*, Przegląd Mleczarski, 2011, s. 39-41.
11. *Kontrole przeprowadzone przez IJHARS*, Przegląd Mleczarski, 2010, s. 44-45.
12. Mituniewicz-Małek A., Ziarno M., Dmytrów I., *Zastosowanie zamrażalniczo utrwalonego mleka koziego do wyrobu potencjalnie probiotycznego napoju fermentowanego*, Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 6(103), 2015, s. 140-149.
13. Mojka K., *Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych,* Problemy Higieny i Epidemiologii, 94(4), 2013, s. 722-729.
14. Paszczyk B., Czerniewicz M., Brandt W., *Skład kwasów tłuszczowych, ze szczególnym uwzględnieniem zawartości kwasu cis9trans11 C18:2 (CLA) oraz izomerów trans kwasu C18:1 i C18:2 w mleku oraz wyprodukowanych z niego kefirach i jogurtach*, Żywność. Nauka. Technologia, Jakość, 1(92), 2014, s. 41-51.
15. PN-A-86061:2002 *Mleko i przetwory mleczne. Mleko fermentowane*.
16. PN-75/A-86130. *Mleko i przetwory mleczarskie. Napoje mleczne. Metody badań.*
17. Prentice A.M., *Dairy products in global public health*, The American Journal of Clinical Nutrition, 99, 2014, s. 1212-1216.
18. Shafiee G., Mortazavian A.M., Mohammadifar M.A., Koushki M.R., Mohammadi A., Mohammadi R., *Combined effects of dry matter content, incubation temperature and final pH of fermentation on biochemical and microbiological characteristics of probiotic fermented milk*, African Journal of Microbiology Research, 4(12), 2010, s. 1265-1274.
19. Sołowiej B., Szafrańska J., *Charakterystyka tradycyjnej mikroflory jogurtowej oraz jej metabolitów*, Przegląd Mleczarski, 3, 2018, s. 10-15.
20. Sosnowska B., Kurek M., *Analiza jakościowa wybranych jogurtów naturalnych dostępnych na rynku lubelskim*, Towaroznawcze Problemy Jakości, 2, 2012, s. 56-64.
21. Weerathilake W.A.D.V., Rasika D.M.D., Ruwanmali J.K.U., Munasinghe M.A.D.D, *The evolution, processing, varieties and health benefits of yogurt,* International Journal of Scientific and Research Publications, 4(4), 2014, s. 1-10.
22. Wichrowska D., Wojdyła T., *Ocena sensoryczna i fizykochemiczna wybranych jogurtów naturalnych i ekologicznych*, Inżynieria i Aparatura Chemiczna, 9, 2014, s. 421-423.

Charakterystyka mlecznych napojów fermentowanych pod względem kwasowości i zawartości tłuszczu

Streszczenie

Obecnie jogurt jest jednym z najczęściej spożywanych mlecznych napojów fermentowanych. Konsumenci cenią jogurty za ich walory smakowe, a także za ich szczególną wartość odżywczą i prozdrowotny wpływ na organizm człowieka. Celem badań była ocena kwasowości oraz zawartości tłuszczu w niektórych jogurtach dostępnych na rynku w odniesieniu do wymagań określonych w Polskich Normach. Ocenie poddano 13 jogurtów naturalnych o zróżnicowanej zawartości tłuszczu, zakupionych na rynku lubelskim. W jogurtach oznaczono: pH, kwasowość potencjalną (°SH) wyrażona, jako ilość kwasu mlekowego oraz zawartość tłuszczu. Kwasowość ocenianych jogurtów naturalnych wyrażona jako ilość kwasu mlekowego była zgodna z wymaganiami Polskiej Normy, tj. jogurty zawierały powyżej 0,6% kwasu mlekowego. Większość badanych prób (70%) spełniała również wymagania odnośnie zawartości tłuszczu, tj. oznaczona ilość tłuszczu była zgodna z podaną na etykiecie. W pozostałych próbach wykazano zaniżoną zawartość tłuszczu w stosunku do deklarowanej, co może świadczyć o nieprawidłowościach na etapie normalizacji lub zaburzeniach podczas procesu produkcyjnego poprzez rozwodnienie produktów wodą.

Słowa kluczowe: jogurt, kwasowość, tłuszcz, deklaracja

Characteristics of fermented milk drinks with regard to acidity and content of fat

Abstract

At present, yoghurt is one of the most commonly consumed fermented milk drinks. Consumers appreciate yogurt for their taste, as well as their specific nutritional value and health-promoting effect on the human body. The aim of the study was to assess the acidity and fat content of yoghurts available on the market in relation to the requirements specified in the standards. There were evaluated 13 natural yoghurts with various fat contents purchased in the Lublin market. Yoghurts were determined: pH, potential acidity (° SH) expressed as the amount of lactic acid and fat content. The acidity of the rated natural yoghurts, expressed as lactic acid, was in line with the requirements of the Polish Standard, i.e. yoghurts contained more than 0.6% lactic acid. Most of the trials (70%) also met the fat content requirements, i.e. the amount of fat determined was as stated on the label. The remaining tests showed an underestimated fat content in relation to the declared one, which may indicate irregularities at the stage of normalization or disturbances during the production process through diluting the products with water.

Keywords: yogurt, acidity, fat, declaration

Indeks autorów:

Gajęcka M. 42
Gajęcki M.T. 42
Godlewska K. 78
Irnazarow I. 94
Kolek L. 94
Mazur M. 20
Serej O. 7
Siucińska E. 106
Stobiecka M. 126
Szuba-Trznadel A. 32
Wajs J. 126
Weron K. 7
Wójcik P. 71
Zielonka Ł. 42