

**LEK. WET. KAMAL ROUBAH**

**Morfologiczne i czynnościowe wykładniki  
zatrucia kurcząt ochratoksyną A**

**PRACA DOKTORSKA**

**Promotor: prof. dr hab. Marek Houszka**

**Katedra Patologii  
Pracownia Ekologii i Chorób Zwierząt Łownych**

**UNIwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu**

**WROCLAW 2010**

*Pragnę podziękować mojemu szanownemu promotorowi prof. Markowi Houszce za okazaną pomoc i cierpliwość przy pisaniu pracy doktorskiej oraz pozostałym osobom za każdą udzieloną wskazówkę.*

**SPIS TREŚCI**

<b>1. Wykaz skrótów</b> .....	4
<b>2. Wstęp</b> .....	5
<b>3. Cel pracy</b> .....	18
<b>4. Materiał i metody badań</b> .....	18
<b>5. Wyniki i omówienie wyników</b> .....	20
<b>6. Dyskusja</b> .....	58
<b>7. Wnioski</b> .....	66
<b>8. Streszczenie</b> .....	67
<b>9. Summary</b> .....	68
<b>10. Piśmiennictwo</b> .....	69

**WYKAZ SKRÓTÓW**

OTA : Ochratoksyna A

OTB : Ochratoksyna B

OTC : Ochratoksyna C

OT $\alpha$  : Ochratoksyna  $\alpha$

AW : Aktywność wodna

BEN : Bałkańska endemiczna nefropatia

MPN : Mykotoksykozowa nefropatia świń

CIN : Przewlekłe śródmiąższowe zapalenie nerek

OE-OA: Etylo-amidowa ochratoksyna

d-OA : Fenyloalninowa forma ochratoksyny

DC-OA: Zdekarboksylowana ochratoksyna

OM-OA : O metylowy ester ochratoksyny

M-O $\alpha$  : Ester metylowy ochratoksyny  $\alpha$

FAO : Światowa Organizacja Dodatków Żywnościowych

WHO : Światowa Organizacja Zdrowia

IARC: Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem.

MRP-2: Białka oporności wielolekowej

CYP: Białka enzymatyczne.

COX: Cyklooksygenazy

LOX: Lipooksygenazy

ATP: Adenozyna trójfosforanowa.

PEPCK: Karboksykinazy- fosfoenolopirogronianu.

MDA: Małylo dialdehyd

NK: Komórki bójcze.

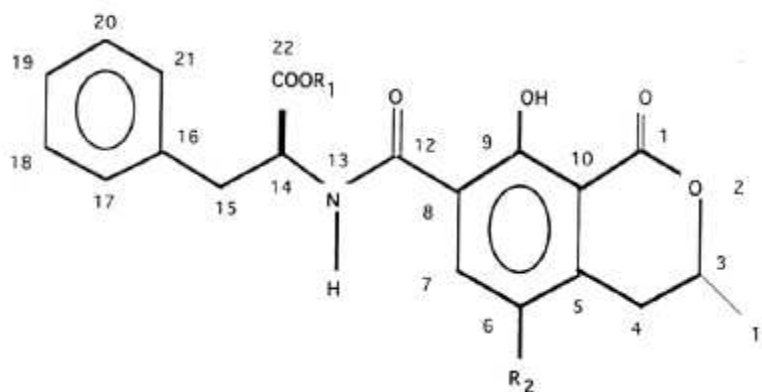
## WSTEP

Grzyby występują w naturze jako heterotroficzne mikroorganizmy. Wytwarzają one węglowodany, kwas cytrynowy i szereg innych kwasów. Niektóre z nich, jak *Aspergillus*, *Penicillium* i *Fuzarium* produkują ponadto drugorzędne metabolity zwane mikotoksynami [1, 4, 87]. Ze względu na znaczne rozpowszechnienie mikotoksyn w paszach i w produktach żywnościowych [8, 45, 79, 80] stanowią one poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Ocenia się, że około 25%, a według niektórych szacunków nawet do 40% ziarna zbóż na świecie skażone jest co najmniej jedną mikotoksyną [16, 17, 36]. Powoduje to ogromne straty ekonomiczne [36, 44, 45, 128]. Mikotoksyny zmniejszają bowiem okres żywotności nasion zbóż, obniżają jakość produktów oraz skracają czas ich przechowywania. Wytwarzanie mikotoksyn przez grzyby pozostaje w ścisłej zależności od warunków środowiskowych [17]. Te toksyczne metabolity grzybów znane są od dawna, jednak możliwość ich powstania w paszach i patogenicznego wpływu na organizm zwierząt nie była brana pod uwagę, aż do czasu wystąpienia ostrego zatrucia u indyków w Anglii w 1960 r. Padło wówczas ponad sto tysięcy ptaków, a przyczyną zatrucia okazało się spożycie paszy skażonej aflatoksyną [17, 64, 82]. Pierwsze przypadki zatrucia ochratoksyną u drobiu zostały opisane w Stanach Zjednoczonych przez Hamiltona i współpracowników w 1982 roku i dotyczyły indyków, kur niosek i kurcząt brojlerów [14, 62, 73]. Stopień skażenia paszy ochratoksyną A w tych przypadkach wahał się od 0,3-16 mg/kg. [28]. Obserwowano zaburzenie wzrostu [28, 30, 42, 73], zmniejszenie produkcji jaj i wysoką śmiertelność [28].

Od tego czasu w wielu laboratoriach na całym świecie podjęto intensywne badania nad mikotoksynami. Aktualnie znanych jest około 400 mikotoksyn [17, 45]. Ze względu na swoją zróżnicowaną budowę chemiczną, mikotoksyny wykazują różne działanie patogenne. Najczęściej działają one nefrotoksycznie [25, 40, 58, 68, 71, 80, 82, 86, 102, 103, 104, 113, 114, 115, 134], hepatotoksycznie [8, 23, 24, 28, 77, 86, 99, 124, 125, 127], cytotoksycznie [2, 10, 11, 12, 23, 50, 65, 118], neurotoksycznie [12, 43, 100, 131] karcinogenicznie [11, 17, 68, 103, 106], estrogenie [131], immunosupresyjne [4, 5, 20, 22, 28, 29, 47, 57, 67, 69, 84, 85, 94, 110, 116, 117, 119, 123, 130], a także teratogenicznie [12, 14, 73].

Największe znaczenie z punktu widzenia toksykologicznego mają: aflatoksyna, ochratoksyna A, patulina, citrinina, rubratokstna, fumonizyny (B1, B2, B3), zearalenon oraz trichotheceny grupy A i grupy B.

Ochratoksyna A (OTA) jest bezbarwną substancją krystaliczną o temperaturze topnienia 90°C, która pod wpływem promieni UV barwi się na niebiesko. Jest ona bardzo dobrze rozpuszczalna w polarnych rozpuszczalnikach organicznych oraz wodnych roztworach o odczynie zasadowym. Słabo natomiast rozpuszcza się w wodzie [82]. Obecność grup fenolowych i karboksylowych w cząsteczce OTA decyduje o jej kwasowym i słabo hydrofilowym charakterze [131]. Uznawana jest za związek należący do grupy metabolitów pentaketydowych [17, 91]. Posiada strukturę złożoną z jednej cząsteczki dihydroizokumaryny (7-carboksy-5-chloro 8-hydroksy-3,4dihydro-3 R-methylizokumaryna) związanej wiązaniem peptydowym z L-β-fenylalaniną (Ryc. 1) [2, 11, 12, 24].



Ryc. 1. Wzór strukturalny ochratoksyny

Jest ona wytwarzana przez jedenaście gatunków grzybów z rodzaju *Aspergillus* oraz dziesięć gatunków grzybów z rodzaju *Penicillium*. Do głównych gatunków grzybów produkujących ochratoksynę A należy: *Penicillium verrucosum*, *P.chrysogenum*, *P.commune*, *P.cyclopium*, *P.politans* i *P.nordicum*, *P. purpurescens*, *P. expansum*, *P. variable* i *P. viridicatum* oraz *Aspergillus ochraceus*, *A. alliaceus*, *A. elegans*, *A. fresenii*, *A. melleus*, *A. ostianus*, *A.petrakii*, *A.sclerotiorum*, *A.sulphureus*, *A. glaucus* [91] i *A. carbonarius* [1]. Badania mykologiczne wskazują, że w ziarnie zbóż ochratoksyna A jest najczęściej produkowana przez grzyby z rodzaju *Penicillium* [49]. Początkowo za głównego producenta ochratoksyny A uznawano *Penicillium viridicatum*. Jednak w roku 1987 na podstawie parametrów morfologicznych, a także wskaźników wzrostu i produkcji toksyn wykazano, że to *P.verrucosum*, a nie *P.viridicatum* jest głównym producentem

ochratoksyny A. Obecnie uważa się, że głównymi gatunkami grzybów wytwarzającymi ochratoksynę A są *P. verrucosum*, *A. ochraceus* oraz *A. carbonarium*.

*P. verrucosum* rozwija się tylko w umiarkowanych temperaturach poniżej 30 °C oraz przy aktywności wodnej<sup>1</sup> poniżej 0,8 P. Dlatego nie występuje on w krajach tropikalnych i subtropikalnych, a najczęściej spotykany jest w krajach strefy umiarkowanej. Z kolei *A. ochraceus* rozwija się w ciepłym klimacie w krajach tropikalnych przy aktywności wodnej 0,8. Podobnie *A. carbonarius* rozwija się w ciepłym klimacie i charakteryzuje się wysoką opornością na promienie słoneczne. Stanowi on główne źródło ochratoksyny A w winie, winogronach oraz w kawie [1]. Pleśnie są organizmami ubikwitarnymi i ich zdolność skażenia zarówno środków spożywczych przeznaczonych do konsumpcji człowieka jak i pasz dla zwierząt jest powszechnie znana [101]. Wzrost tych grzybów nie jest jednak równoznaczny z wytwarzaniem przez nie dużej ilości ochratoksyn, które zależne jest od szeregu czynników wewnętrznych jak aktywność wodna, pH oraz potencjał *redox*, a także zewnętrznych jak wilgotność względna, temperatura, dostępność tlenu oraz jakość i skład substratu [17]. Wytwarzanie ochratoksyny przez *Aspergillus sp.* jest wyższe w substracie składającym się z ziarna arachidowego i soi niż w substracie złożonym z ziarna zbóż i ziarna kukurydzy. Z drugiej strony zboża stanowią lepszy substrat dla produkcji ochratoksyny A przez *Penicillium verrucosum*. Wykazano także, że produkcja ochratoksyny A jest większa w miejscach naświetlonych niż w ciemnych, a także w obecności jonów żelaza, miedzi i cynku oraz przy pH-5,5. Wzrost pH wpływa zdecydowanie hamująco na syntezę ochratoksyny. Ważnym czynnikiem decydującym o rodzaju produkowanej ochratoksyny, a co za tym idzie stopniu jej toksyczności jest także wiek hodowli grzybów. Najbardziej toksyczne formy ochratoksyny wytwarzane są przez grzybnie po jedenastu dniach wzrostu [45].

Toksyczne metabolity grzybów *Aspergillus* mogą występować w wielu produktach spożywczych. Stwierdzano je w orzeszkach ziemnych [20, 82], ziarnie zbóż [1, 36, 45], nasionach bawełny, żyta, przeniżyta, jęczmienia, rzepaku, owsa [41], sorgo, kakao [12], ziarnie kawy [12, 24], sianie, chmielu [82], ryżu [20, 114], wędzonym mięsie [45, 82], orzechach brazylijskich [82], ziarnie kukurydzy [1, 20, 41, 71], suszonych rybach [82], nasionach roślin oleistych pochodzących ze strefy tropikalnej i subtropikalnej, trawach, roślinach strączkowych [64], ziarnie grochu [82], mieszankach paszowych dla drobiu

---

<sup>1</sup> aktywność wodna = stosunek ciśnienia pary wodnej danego produktu do ciśnienie pary wody czystej w tej samej temperaturze.

[82], sokach owocowych, winie, piwie [1], produktach mleczarskich [41, 45] a także w chlebie [45]. Wysokie stężenie *ochratoksyny A* (50 µg/kg) zostało stwierdzone w przyprawach korzennych i ziołach leczniczych [82]. Występuje ona również w suszonych figach (60-120 µg/kg), winogronach (250 µg/kg) oraz w śliwkach (210-280 µg/kg). Natomiast w sokach owocowych występuje w niewielkich ilościach. W soku grejpfrutowym stwierdzono 1,3 µg *ochratoksyny A*/litr, w soku pomidorowym 0,032 µg/litr, a w soku z czarnej porzeczki 0,06 µg/litr. Spotykana jest również w warzywach i owocach. W pomidorach było jej 1,44 µg/kg, w wiśniach 2,71 µg/kg, figach 7,5 µg/kg, a w truskawkach 1,44 µg/kg. Nieoczekiwanie wysokie stężenie *ochratoksyny A* w rzędu 33000 µg/kg stwierdzono w Tunezji w ziarnie pszenicy i jęczmienia, mielonych zbożach, suchych warzywach i oliwkach [70]. Ale także w krajach Unii Europejskiej około 20% zbieranych zbóż przeznaczonych do produkcji zarówno produktów żywnościowych jak i pasz dla zwierząt skażonych jest mikotoksynami w ilościach wykrywalnych laboratoryjnie [36]. Średnie skażenie pasz *ochratoksyną A* kształtuje się na poziomie około 100-500 µg/kg, a w przypadku nieprawidłowych warunków przechowywania może osiągać wartości nawet powyżej 5000 µg/kg [15]. W krajach europejskich w zbożach i produktach pochodnych wykryto obecność mikotoksyn w stężeniach: 0,1 – 12,5 – 206 – 442 µg/kg. W Polsce (w latach 1984-85) w 63 na 368 badanych próbek chleba stwierdzono obecność mikotoksyn w średnim stężeniu 1360 µg/kg, a w 48 na 215 badanych próbek mąki stwierdzono obecność mikotoksyn o średnim stężeniu 4370 µg/kg.

Zanieczyszczenie *ochratoksyną A* (OTA) mięsa i przetworów mięsnych, a także jej znaczna trwałość w trakcie procesów technologicznych produkcji żywności staje się poważnym problemem dla zdrowia ludzi [45]. Jej obecność stwierdzono także we krwi, wątrobie i nerkach zwierząt poddanych ubojowi [108]. Badania przeprowadzone w krajach byłej Jugosławii i w Kanadzie wykazały obecność *ochratoksyny A* na poziomie 10-229 ng/ml we krwi loch poddanych ubojowi [108].

Na Bałkanach występuje ona powszechnie w produktach żywnościowych oraz w paszach, a w surowicy krwi mieszkających tam ludzi stwierdza się około 50 Nm *ochratoksyny* [38]. Powoduje ona groźną chorobę zwaną bałkańską endemiczną nefropatią (BEN) [7, 11, 12, 25, 68, 101, 102, 103, 106, 107, 135]. Choroba pojawiła się po raz pierwszy w latach 50 w Jugosławii, Rumunii i Bułgarii i była wiązana ze spożyciem owoców skażonych *ochratoksyną A*. W początkowej fazie choroby nie obserwuje się wyraźnych objawów patognomicznych, co utrudnia wczesną jej diagnozę. Niedokrwistość



normochromatyczna wyprzedza typowe objawy kliniczne wskazujące na dysfunkcję nerek. Częstotliwość występowania tej choroby w zagrożonych populacjach wynosi około 2-25%, a średni wskaźnik śmiertelności według oficjalnych statystyk w latach 1957-1984 wynosił 3% rocznie [101], przy czym kobiety są bardziej wrażliwe niż mężczyźni [34, 73, 101]. Ostatnie badania wskazują, że na terenach dotkniętych bałkańską endemiczną nefropatią ochratoksyna A obecna jest we krwi 6-18% populacji ludzkiej [34]. Choroba ma charakter przewlekły i rozwija się w ciągu kilku lat z postępującym rozlanym włóknieniem nerek [17, 34]. U jednego na trzech pacjentów umierających na bałkańską endemiczną nefropatię notowano także brodawczaki lub raki miedniczki nerkowej, moczowodów i pęcherza moczowego [73, 103]. Badania mikrobiologiczne wykazały obecność bakterii z rodzaju *Enterobacter*, *Proteus* oraz *E.coli* w moczu i kale [104]. U zwierząt ochratoksyna została uznana za główny czynnik etiologiczny przewlekłej mikotoksykozy nefropatii świń (MPN) [25, 104, 105, 108]. Po raz pierwszy stwierdzono ją w Danii, a następnie w Bułgarii [108]. Choroba rozwija się w ciągu kilku miesięcy, a jej najbardziej widoczną cechą jest powiększenie nerek. Dlatego w Danii wszystkie świny wykazujące w rutynowych badaniach poubojowych powiększenie nerek badane są w kierunku obecności ochratoksyny A, a w przypadku stwierdzenia w nerkach ilości przekraczających 10 µg/kg cała tusza podlega konfiskacie. Średnia zawartość ochratoksyny A wywołująca mykotoksykozową nefropatię świń wynosi około 200µg/kg. W surowicy krwi świń pochodzących z tego regionu stwierdzano w 1994 roku średnio 60.9 ng/ml ochratoksyny A, a w tkance nerkowej 42-427 ng/g. Zarówno bałkańska endemiczna nefropatia jak i MPN charakteryzują się zmianami zwyrodnieniowymi komórek nabłonka proksymalnych kanalików nerkowych oraz śródmiąższowym włóknieniem nerek [17, 55, 68, 80]. Kliniką konsekwencją tych procesów jest poliuria oraz zmiany parametrów biochemicznych i hematologicznych krwi [105]. U drobiu karmionego przez rok paszą skażoną ochratoksyną A w stężeniu 0,3-1 mg/kg rozwija się nefropatia charakteryzująca się zwyrodnieniem nabłonka proksymalnych i distalnych kanalików nerkowych ze znacznym zaburzeniem funkcji nefronu. Dla drobiu ochratoksyna A jest trzykrotnie bardziej toksyczna niż aflatoksyna [50]. Nic więc dziwnego, że zatrucia obserwujemy właśnie w tej grupie zwierząt. Brojlery otrzymujące jednorazowo paszę zawierającą ochratoksynę A w ilości 16 mg/kg wykazują cechy ostrej ochratoksykozy charakteryzującej się apatią, biegunkami, zaburzeniem koordynacji ruchowej, wyczerpaniem oraz śmiercią kurcząt w ciągu 22-25 godz. [53]. Bardzo wrażliwe na ochratoksynę A są także świny i psy [113, 114, 115]. Dawka u świń powyżej

1,4 mg/kg powoduje znaczne uszkodzenie nerek, anoreksję, wielomocz, wymioty, podwyższoną temperaturę, odwodnienie, zapalenie spojówek, zapalenie gardła, ogólne osłabienie przechodzące w skrajne wyczerpanie i śmierć zwierząt [115].

Natomiast u przeżuwaczy ochratoksykoza jest rzadko spotykana, ponieważ obecne w zwacu mikroorganizmy mają zdolność hydrolizy ochratoksyny A do słabo toksycznej ochratoksyny  $\alpha$  (OT $\alpha$ ) i fenyloalaniny [15, 73, 131]. Przewlekłe zatrucie OTA przebiega ze zmniejszeniem spożycia paszy, wzmożonym pragnieniem i zmianami w nerkach [113, 114, 115]. Natomiast przewlekłe zatrucie ochratoksyną A u drobiu charakteryzuje się zaburzeniem wzrostu [59, 60], krzepnięcia krwi, fagocytozy [52, 123], integralności tkanki kostnej [26, 27, 28, 48, 52, 54, 89, 122, 126 129] i nabłonka jelitowego [16]. Zaburzony zostaje ponadto proces glikogenezy, poziom białka całkowitego, albumin, globulin, cholesterolu, trójglicerydów, potasu, kwasu moczowego, kreatyniny oraz  $\gamma$ -glutamylotransferazy [73]. Karmienie niosek przez 4 tygodnie paszą skażoną ochratoksyną A w ilości 2,6 ppm obniżyło nieśności o 38 %, a 5,2 ppm zmniejszyło nieśności o 62% [82].

FAO/WHO ustaliły 112 ng/kg masy ciała jako orientacyjną tolerowaną tygodniową dawkę ochratoksyny, która odpowiada dawce dziennej na poziomie 16 ng/kg masy ciała. Dawka ta została obliczona na podstawie najniższego poziomu ochratoksyny powodującego uszkodzenie nerki świń, które są gatunkiem najbardziej wrażliwym [73]. W krajach Unii Europejskiej maksymalna dopuszczalna dawka ochratoksyny A wynosi 5  $\mu$ g/kg w zbożach (ryż, jęczmień) 3  $\mu$ g/kg dla produktów zbożowych i ziarna zbóż przeznaczonego bezpośrednio dla konsumpcji człowieka oraz 10  $\mu$ g/kg dla suszonych owoców przeznaczonych do produkcji win [1]. W wielu krajach świata zostały przeprowadzone badania nad obecnością ochratoksyny A w krwi ludzi zdrowych. Jej największą zawartość odnotowano w Danii oraz Tunezji, odpowiednio 1,6 ng/ml, 1,2 ng/ml. W innych krajach średnia ta wynosi dla Słowacji 0,14 ng/ml, Szwecji 0,17 ng/ml, Czech 0,23 ng/ml, Chorwacji 0,39 ng/ml, Włoch 0,53 ng/ml, Hiszpanii 0,71 ng/ml, Niemiec-0,79 ng/ml, Kanady 0,88 ng/ml, Bułgarii 1,0-10,0 ng/ml, Węgier 0.1-1.4 ng/ml, a Francji i Japonii- zaledwie 0,068 ng/ml. W Polsce badania te zostały przeprowadzone przez Golińskiego w latach 1983-1984 oraz 1984-1985 i wykazały średnio 0,21-0,31 ng/ml ochratoksyny A w surowicy ludzi. Międzynarodowa agencja badań nad rakiem (IARC), oceniając wpływ ochratoksyny A na organizm człowieka i zwierząt, uznała jej karcinogenne działanie i zakwalifikowała ją do grupy 2B karcinogenów [1, 17, 33, 69].

Biorąc pod uwagę jej potencjalne działanie rakotwórcze określono dzienną dawkę ochratoksyny wynoszącą 5 ng/kg masy ciała jako całkowicie bezpieczną [73].

Poszczególne gatunki zwierząt wykazują więc różną wrażliwość na ochratoksynę A, co obrazuje Tab. 1.

Tab. 1. Dawka DL<sub>50</sub> ochratoksyny dla różnych gatunków zwierząt

Zwierzę	DL <sub>50</sub> (mg/kg masy ciała)	Droga podania
Mysz (samiec)	51÷68	Doustnie
Mysz (samica)	22	Dootrzewnowo
Szczur (samiec/ samica)	12,6/ 14,3	Dootrzewnowo
Brojler	3,3	Doustnie
Indyk	5,9	Doustnie
Świnia	1	Doustnie
Pies	0,2	Doustnie
Świnka morska (samiec/samica)	9,1/8,1	Doustnie

Faucet-Margquis V. [33].

### Metabolizm i kinetyka

Mikotoksyny wnikają do organizmu najczęściej drogą pokarmową. Mogą one jednak wnikać również drogą oddechową, przez skórę bądź przez spojówki. Do płodu przenikają przez łożysko [12, 15], a także z mlekiem matki [131]. Niewielka ilość ochratoksyny A jest wchłaniana przez błonę śluzową żołądka w postaci niezjonizowanej na zasadzie dyfuzji biernej [33, 73]. Głównym miejscem wchłaniania mikotoksyn, a w szczególności ochratoksyny A jest jednak jelito cienkie, zwłaszcza proksymalna część jelita czczego [33, 44, 111, 112]. Ochratoksyna A wchłaniania jest w 66% w jelitach świń, w 56% w jelitach królików i w 40% u brojlerów [33, 37]. Wchłanianie następuje na zasadzie dyfuzji biernej. Proces wchłaniania jest jednak ograniczony przez pompę aktywnego transportu anionów organicznych MPR-2 na szczytowej powierzchni enterocytów. Po wchłonięciu z krwią żyły wrotnej dostaje się do wątroby i dalszych narządów. W 99% zostaje ona związana z białkami surowicy krwi i tylko niewielka ilość pozostaje we krwi (w postaci wolnej) [17]. W szczególności łączy się z albuminami surowicy oraz z niezidentyfikowaną makrocząsteczką o masie molekularnej 20 kDa [17, 33, 37, 38, 73, 80]. Mechanizm, poprzez który ochratoksyna A łączy się z albuminami nie jest dokładnie

wyjaśniony. Według jednych doniesień łączy się ona w postaci di-anionów z podjednostkami IIA i IIB albumin surowiczych [33]. Może to opóźniać transport ochratoksyny A do narządów wewnętrznych i wydłużać jej okres półtrwania, prowadząc w konsekwencji do przewlekłych efektów toksycznych [73, 80]. Połączenia te mogą być jednak konkurencyjnie zastępowane innymi ligandami anionowymi, takimi jak aminotransferazy, fenyloalanina oraz niektóre niesterydowe leki przeciwzapalne. Okres półtrwania OTA jest najdłuższy u ludzi i wynosi 30 dni, u małąp wynosi on 21 dni, u świń 75-120 godz., a u szczurów 55-230 godz. Stężenie ochratoksyny A i jej metabolitów w surowicy zależy od takich parametrów jak wysokość dawki, czas ekspozycji, droga podania, okres półtrwania, od tego czy jest ona podana naturalnie w paszy czy w postaci czystej oraz od stopnia wiązania z białkami surowicy [33]. U świń, ptaków i szczurów najwyższe stężenia ochratoksyny A w organizmie stwierdza się w nerkach, mięśniach, wątrobie i tkance tłuszczowej [78].

### **Transport**

Jak już wspomniano, ochratoksyna absorbowana jest głównie w odcinku bliższym jelita czczego. Wnika ona do komórek zarówno za pośrednictwem aktywnego transportu jak i drogą biernej dyfuzji. Wnikanie to jest jednak redukowane przez aktywność pomp zlokalizowanych w błonie szczytowego obszaru enterocytów. Są to transportery anionów organicznych zwane białkami oporności wielolekowej MRP-2 (Multidrug Resistance Protein-2) [33]. Gekle i współpracownicy wykazali, że w komórkach nabłonka proksymalnych kanalików nerkowych wymiana zachodząca na szczytowej powierzchni błony komórkowej jest inna niż ta na poziomie powierzchni przypadkowej i bocznej komórki [39]. Na poziomie szczytowej powierzchni nabłonka kanalików nerkowych aktywny transport ochratoksyny A odbywa się poprzez transportery fenyloalaniny, H<sup>+</sup>/dipeptydów oraz anionów organicznych. Natomiast na powierzchni przypadkowej i bocznej komórki tylko za pośrednictwem transporterów anionów organicznych [33].

### **Ekskrecja i eliminacja**

Ochratoksyna A jest eliminowana z organizmu z moczem, żółcią oraz z kałem [33, 112, 131]. Część wydalana z żółcią może być ponownie absorbowana w obrębie jelit. Jednak około 30-40% ochratoksyny A jest wydalane drogą moczową. W nerkach jest ona filtrowana w kłębkach nerkowych i z moczem pierwotnym dostaje się do światła proksymalnych kanalików krętych, skąd może być częściowo reabsorbowana i ponownie

wraca do krwi. Eliminacja poszczególnych ochratoksyn jest zróżnicowana (Tab. 2). Badania przeprowadzone przez Li i wsp. wykazały, że u szczurów czas półtrwania ochratoksyny A jest najdłuższy i wynosi 103 godziny. Czas półtrwania metabolitów OTA wynosi: dla Op-OTA 50 godz., dla OT  $\alpha$  9,6 godz., dla 4-OH-OTA 6 godz., dla OTB 4,2 godz., a dla OTC 0,6 godz. [33]. Ochratoksyna A, ochratoksyna B oraz ochratoksyna  $\alpha$  są eliminowane głównie drogą moczową (48%). Natomiast 4-OH-OTA jest eliminowana głównie drogą żółciową (41%) [33].

Tab. 2. Ochratoksyna i jej metabolity

NAZWA	R1	R2
Ochratoksyna A (OTA)	H	Cl
Ochratoksyna B (OTB)	H	H
Ochratoksyna C (OTC)	CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>	Cl
Ochratoksyna A ester metylowy (metylowy ester fenyloalaniny)	H	Cl
Ochratoksyna B ester metylowy (metylowy ester fenyloalaniny)	H	H
Ochratoksyna B ester etylowy (ester etylowy fenyloalaniny)	H	H

Rouvier. M., Toulouse 2002 [93] (R1, R2 - patrz Ryc. 1)

### Metabolizm

In vitro ochratoksyna A jest hydrolizowana przy udziale enzymów trawiennych, tj.  $\alpha$  chymotrypsyny i karboksypeptydazy do ochratoksyny  $\alpha$  [61] i fenyloalaniny [15, 131]. Inkubacja ochratoksyny A z mikrosomami komórek wątrobowych szczura, świni i człowieka, a także w hodowli komórkowej nerki małp i nabłonka oskrzelowego człowieka prowadzi do powstania dwóch epimerów hydroksylowanych, tj. 4-R-hydroksyochratoksyny A (4R-OHOA) i 4-S-hydroksyochratoksyny A [24, 33, 109]. Natomiast inkubacja ochratoksyny A z mikrosomami komórek wątrobowych królika lub nerki świni prowadzi do powstania 10-hydroksyochratoksyny A (10-OHOA) [33, 109]. Wszystkie te transformacje są zależne od systemu mikrosomalnego mono-oksigenazy cytochromowej i CYP P-450 oraz peroksydazy [93]. Niektórzy autorzy sugerują, że ochratoksyna A jest słabo metabolizowana przez białka enzymatyczne P-450, a jej toksyczne oddziaływanie wynika bardziej ze stresu oksydacyjnego [2, 33, 39]. Dlatego dodawane do paszy witaminy A, C i E - mające właściwości przeciwutleniające - zmniejszają jej patogenne działanie. Witaminy A i E modulują ponadto aktywność enzymów kaskady kwasu arachidonowego w szczególności cyklooksigenazy (COX) i lipooksigenazy (LOX) [33].

### **Mechanizm działania**

Ochratoksyna A wykazuje różnorodne działania patogenne, ale przede wszystkim działa nefrotoksycznie [6, 19, 25, 66, 68, 80, 81, 82, 113, 114, 115, 120, 121, 133, 134]. Jest ona uznana za jeden z głównych czynników etiologicznych wielu chorób nerek o przebiegu ostrym i przewlekłym. U świń typowe objawy kliniczne występują już po skarmianiu ich paszą zawierającą 1400 µg/kg paszy [73]. W wysokich dawkach powoduje także uszkodzenie strukturalne jelit i wątroby [113]. U szczurów karmionych przez 8-12 tygodni dietą skażoną ochratoksyną A w stężeniu 2 mg/kg następuje zmniejszenie aktywności dehydrogenazy mleczanowej, fosfatazy alkalicznej, leucyno-aminopeptydazy, gamma-glutamyl-transferazy oraz N-acetylo-β-D-glukozo-amidazy we krwi [33]. Działanie nefrotoksyczne polega na uszkodzeniu mechanizmu odpowiedzialnego za transport anionów organicznych w rąbku szczoteczkowym komórek nabłonka proksymalnych kanalików nerkowych [95]. Zaburzenia funkcji nerki, a w szczególności kanalików nerkowych prowadzą do zwiększenia objętości moczu (poliuria), zawartości glukozy (glikozuria) i białka (białkomocz) oraz przenikania do moczu gamma-glutamyl-transferazy, fosfatazy alkalicznej oraz leucyno-aminopeptydazy (enzymuria). Zarówno glikozuria jak i proteinuria powstają na skutek zaburzenia reabsorpcji w proksymalnych kanalikach nerkowych [104]. Dożylne podanie szczurom ochratoksyny A w dawce 3 nmol/kg masy ciała spowodowało wzrost pH w kanalikach krętych i kanalikach zbiorczych oraz we wstępujących i zstępujących naczyniach prostych, a także wzrost stężenia jonów wodorowęglanowych w kanalikach nerkowych. Zaburzenie pH w tkance śródmiąższowej okolicy brodawki nerkowej może spowodować zaburzenie w procesie zakwaszanie moczu i prowadzić do jego alkalizacji. Z tego powodu wielu autorów sugeruje, że zaburzenie homeostazy pH może w znaczący sposób naruszyć równowagę kwasowo-zasadową ustroju oraz wzmacniać nefrotoksyczne działanie OTA [63].

Ochratoksyna A powoduje zmiany regresywne układu limfatycznego drobiu [21, 22, 29, 57, 85], wpływając na zmniejszenie liczby limfocytów [14, 21, 42, 47, 57, 102] oraz wywiera niekorzystny wpływ na odpowiedź immunologiczną typu komórkowego [21, 31], a w niektórych przypadkach osłabia także odpowiedź typu humoralnego [73, 103, 104]. Sam mechanizm immunosupresyjnego działania miktotoksyn, a w szczególności ochratoksyny A nie jest do końca wyjaśniony, ale wielu autorów sugeruje, że hamowanie syntezy białek [2, 9, 10, 11, 12, 25, 47, 55, 68, 76, 94] wpływa negatywnie na podział mitotyczny szybko dzielących się komórek układu immunologicznego [47, 102]. Ostatnie badania ptaków karmionych paszą skażoną ochratoksyną A w stężeniu 2-4

mg/kg w okresie 21 dni wykazały spadek białka całkowitego surowicy krwi, liczby limfocytów oraz zmniejszenie masy narządów limfatycznych jak grasica, torba Fabrycjusza oraz śledziona [28, 57]. Ponadto zmniejsza ona aktywność dopełniacza oraz osłabia aktywność makrofagów spełniających istotną rolę w nieswoistej odpowiedzi immunologicznej. Działanie immunosupresyjne ochratoksyny A silnie zaznacza się u kurcząt i indyków natomiast w znacznie mniejszym stopniu u przepiórek i kaczek [130]. Ptaki narażone są najczęściej na pobieranie paszy zawierającej niskie dawki mikotoksyn. Prowadzi to do ogólnego osłabienia odporności organizmu, co zwiększa wrażliwość ptaków na różne choroby [103, 107, 128] bakteryjne jak salmonelloza [31, 35, 104], kolibakterioza [62, 104], wirusowe jak choroba Gumboro, choroba Mareka oraz pasożytnicze jak kokcydioza [56]. U indyków, a także u brojlerów w przebiegu zatrucia ochratoksyną często notowane są zapalenia worków powietrznych [28, 29, 62, 73].

Ochratoksyna A powoduje zaburzenia oddychania mitochondrialnego [33, 38, 40, 46, 73, 102, 105] w wyniku dysfunkcji transporterów fosforu w błonie mitochondrialnej oraz zaburzeniem aktywności ATP-azy w wewnętrznej błonie mitochondrialnej [73]. Ponadto konkurencyjnie hamuje ona aktywność dehydrogenazy bursztynianowej i oksydazy cytochromowej C, a także hamuje aktywność enzymów cyklu Krebsa powodując obniżenie produkcji ATP, który jako źródło energii niezbędny jest do produkcji cholesterolu. Peroksydacja nienasyconych kwasów tłuszczowych [2, 11, 12, 40, 68, 80, 96] tworzących struktury błon komórkowych jest ważnym kierunkiem działania wielu ksenobiotyków, w tym również ochratoksyny, prowadząc do zaburzenia homeostazy wapniowej komórki ze wzrostem poziomu wolnego wapnia w cytoplazmie, a w następstwie uszkodzenia komórek i tkanek. Wzmożona peroksydacja tłuszczów błonowych w przebiegu ochratoksykozy może prowadzić do uszkodzenia i martwicy komórek kanalików nerkowych.

### **Hepatotoksyczność**

Klinicznym wyrazem hepatotoksycznego działania ochratoksyny A jest zmniejszenie poziomu białka całkowitego, albumin, cholesterolu [81, 107], trójglicerydów oraz zmniejszenie aktywności gamma-glutamyl-transferazy i cholinesterazy w surowicy krwi [52]. W procesie detoksyfikacji ochratoksyny A w wątrobie powstają jej metabolity jak 4-hydroksy-ochratoksyna A [131]. W procesie tym istotną rolę odgrywa białko enzymatyczne cytochrom CYP P- 450 znajdujące się w mikrosomach komórek wątrobowych, które powodują przekształcenie ochratoksyny A w hydroksy-ochratoksynę

A (OH-OTA) [131]. Ponadto wykazano, że ochratoksyna A zaburza metabolizm węglowodanów [11, 12, 38, 131] u szczurów. Po jednorazowej doustnej dawce 15 mg/kg masy ciała następowało obniżenie stężenia glikogenu w wątrobie oraz wzrost stężenia glikogenu w sercu i glukozy w surowicy.

Ochratoksyna A konkurencyjnie hamuje mitochondrialne białka transportowe wątroby szczura, co może być przyczyną zmniejszenia produkcji energii niezbędnej do syntezy cholesterolu i prowadzić do obniżenia jego stężenia w surowicy [107]. Zaburzenie syntezy cholesterolu może także być następstwem zmniejszenia syntezy białek będących nośnikami steroli [73, 105]. Ochratoksyna A posiada zdolności wiązania z albuminami [11, 12, 15, 17, 38, 39, 41, 46, 79, 80], co utrudnia jej przenikanie z krwiobiegu do komórek wątrobowych oraz nerkowych, a w konsekwencji jej eliminację z organizmu [73, 80, 131]. W celu utrzymania ochratoksyny A we krwi, organizm może okresowo zwiększyć wytwarzanie albumin, co minimalizuje uszkodzenie narządów [81]. OTA może hamować metabolizm zarówno glukozy, jak i insuliny, powodując gromadzenie glikogenu w wątrobie. Następuje zmniejszenie aktywności karboksykinazy-fosfoenolopirogronianu (PEPCK) ze znaczną redukcją procesu neoglukogenezy nerkowej [16, 73, 131].

### **Cytotoksyczność**

Ochratoksyna A pierwotnie uszkadza enzymy związane z metabolizmem fenyloalaniny. Hamuje ona enzymy zaangażowane w syntezę kompleksu fenyloalanina- t-RNA. Może również współreagować z innymi enzymami, które używają fenyloalaniny jako substratu, np. hydroksylazą fenyloalaninową, która katalizuje nieodwracalną hydroksylację fenyloalaniny do tyrozyny [73]. Zajmuje ona miejsce fenyloalaniny i powoduje zaburzenie biosyntezy białek, głównie glikoprotein i lipoprotein, budujących struktury błon komórkowych. Jako inhibitor biosyntezy białek powoduje destabilizację struktur błon plazmatycznych plemników [13]. Podawana dzikom w paszy w dawce 0,08 mg/kg powoduje w ciągu 24 godz. zmniejszenie objętości ejakulatu, żywotności oraz ruchliwości plemników [13].

Zatrucie mikotoksynami powoduje powstawanie rodników nadtlenkowych [2, 11, 80, 40], które uszkadzają błony plazmatyczne i DNA [14, 23, 24, 25, 88, 106], RNA [14, 25, 46, 106] oraz mitochondria [38, 40, 46, 73, 94, 96, 107]. Powstawanie rodników nadtlenkowych odgrywa kluczową rolę w patogenezie wielu chorób, w tym również wywołanych ochratoksyną A [2, 96]. W następstwie rozpadu makromolekuł dochodzi do



wzrostu malonylo-di-aldehydu (MDA) [38], który stanowi końcowy produkt peroksydacji tłuszczów i uznawany jest za biomarker stresu oksydacyjnego i uszkodzenia komórki [38].

### **Teratogenność**

Ochratoksyna A wykazuje działanie teratogenne powodując różne anomalie morfologiczne u szczurów oraz u embrionów kurzych. Poprzez łożysko trafia do płodu, gdzie ulega kumulacji [12, 17, 38]. Powoduje zarówno u szczurów, jak i u myszy destabilizację wielu parametrów związanych ze wzrostem oraz różnicowaniem komórek, co tłumaczy jej patogenne działanie na rozwój płodów [17]. Karcinogenne działanie ochratoksyny A na zwierzęta i ludzi nie jest dokładnie wyjaśnione. Prawdopodobnie jest ono związane ze zmniejszeniu aktywności fagocytarnej makrofagów [69, 73, 102, 104, 131]. Poprzez specyficzne hamowanie aktywności endogennego interferonu [104] osłabiona zostaje także funkcja komórek NK odpowiedzialnych za niszczenie komórek nowotworowych [73, 106, 131].

## **CEL PRACY**

Celem pracy było określenie wpływu skarmiania kurcząt brojlerów paszą zawierającą ochratoksynę A na strukturę mikroskopową narządów i tkanek oraz wpływ tych zmian na parametry kliniczne ptaków. Obszarem szczególnego zainteresowania były zmiany zachodzące w obrębie układu pokarmowego, układu immunologicznego, kości i nerek.

## **MATERIAŁ I METODY**

Biosyntezę ochratoksyny A przeprowadzono stosując jako podłoże ziarno pszenicy inokulowane szczepem KA-10 *Aspergillus ochraceus* i inkubowane w temperaturze 28 °C przez 192 godz. Końcowe stężenie ochratoksyny w kulturze wynosiło 102,4 mg/kg.

Badania przeprowadzono na 30 sztukach 14 dniowych kurcząt brojlerów krzyżówki COB-500 odchowanych w warunkach fermowych. Ptaki zostały podzielone na cztery grupy, w tym dwie grupy kontrolne (K-0/25) i (K-0/35) oraz dwie grupy doświadczalne (K-1) i (K-2). Grupy kontrolne K-0 otrzymywały standardową paszę wolną od ochratoksyny. Była to dobrze zbilansowana pasza charakteryzująca się wysokim poziomem białka, aminokwasów, energii, witamin i związków mineralnych. Kurczęta doświadczalne karmiono tą samą paszą z dodatkiem ochratoksyny A. Pasza wraz ochratoksyną była mieszana w mieszalniku bębnowym przez cztery godziny. Po zakończeniu mieszania pobrano pięć próbek paszy w celu oznaczenia stężenia ochratoksyny. Oznaczenie wykonano metodą wysokociśnieniowej chromatografii cieczowej (HPLC). HPLC- FLD według procedury badawczej PB 09/CH- metodą akredytowaną przez Polskie Centrum Akredytacji. ( NR. Akredytacji AB 584). Po pierwszym oznaczeniu dodawano kulturę *A.ochraceus* z ochratoksyną aż do uzyskania wymaganego stężenia 6 mg/kg. Ptaki doświadczalne otrzymywały tak przygotowaną paszę przez okres 10 dni (grupa K-1) i 20 dni (grupa K-2). Badanie wykonano w wiwarium Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za zgodą II Lokalnej Komisji Etycznej we Wrocławiu nr 57/2009 z dnia 20.04.2009. W jednym pomieszczeniu zostały umieszczone kurczęta kontrolne, a w drugim kurczęta doświadczalne. Wszystkie ptaki miały wolny dostęp do paszy i wody. Przez cały okres trwania doświadczenia wszystkie grupy były obserwowane cztery razy dziennie: o godz. 7.30, 11.00, 14.00 oraz o godz. 20.00. Kurczęta zostały zważone w dniu rozpoczęcia doświadczenia, trzeciego, dziesiątego oraz dwudziestego dnia doświadczenia. Codziennie oceniano stan kliniczny ptaków. Po zakończeniu doświadczenia obliczono ilość paszy zjedzonej przez ptaki kontrolne i doświadczalne. W 10 i 20 dniu doświadczenia od pięciu kurcząt z każdej

grupy kontrolnej i dziesięciu kurcząt z grupy doświadczalnej pobrano 5 ml krwi z żyły skrzydłowej celem określenia parametrów biochemicznych aparatem MAXMAT PL.

Oznaczano:

- Fosfatazę alkaliczną IFCC/AMP.
- Albuminy metodą kolorymetryczną BCG.
- Kwas moczowy metodą enzymatyczną DST.
- Kreatyninę metodą kinetyczną Jaffe.

Następnie kurczęta zostały poddane eutanazji poprzez przerwanie ciągłości kręgow szyjnych i wykonano badanie sekcyjne. W trakcie sekcji pobierano wycinki narządów wewnętrznych: żołądka gruczołowego, nerki, torby Fabrycjusza, śledziony, wątroby, jelita czczego, jelita biodrowego, mózgowia oraz kości piszczelowej do badań histopatologicznych. Torba Fabrycjusza i śledziona zostały uprzednio zważone. Z pobranych wycinków wykonano skrawki parafinowe grubości 5  $\mu\text{m}$  barwione hematoksyliną i eozyną [18]. Wycinki tkanki kostnej zostały uprzednio poddane 10 dniowej kąpieli w mieszaninie odwapniającej 10% wersenianu sodu, a przez następne 10 dni w mieszaninie kwasu mrówkowego i cytrynianu sodu [18]. Preparaty oceniano w mikroskopie świetlnym. Ponadto wykonano badania morfometryczne długości kosmków i głębokości krypt jelita czczego i biodrowego oraz wielkości grudek chłonnych torby Fabrycjusza, wykorzystując system komputerowo wspomaganą analizę obrazu Multi-Scan Base V.8 pracującego w środowisku Windows i sprzężony z mikroskopem Axiophot firmy Zeiss. W każdym preparacie jelita mierzono dziesięć wzdłużnie przeciętych kosmków, a w torbie Fabrycjusza najdłuższą i najkrótszą oś grudek chłonnych obliczając pole powierzchni (P) według wzoru:

$$P = \frac{a \cdot b}{2} \cdot \pi$$

gdzie:

a - najdłuższa oś

b – najkrótsza oś.

Natomiast pomiary grubości ściany, wielkości jamy szpikowej oraz stopnia porowatości kości piszczelowej wykonano przy użyciu mikroskopu Nikon Eclipse 80i z oprogramowaniem Nis Elements Ar. W pomiarach tych wyznaczono ilość tkanki kostnej w obrębie trzonu kości piszczelowej w stosunku do badanej powierzchni w 10 kolejnych

polach widzenia dla jednej próbki. Następnie wyniki uśredniano i wyznaczano stopień porowatości kości. Z kości piszczelowej pobrano także materiał do badań w skaningowym mikroskopie elektronowym (SEM), aby określić jej skład pierwiastkowy. Materiał ten został odwodniony w szeregu acetonowym i wysuszony w punkcie krytycznym. Preparaty badano w SEM firmy EVO LS 15 Zeiss wyposażonym w mikrosondę rentgenowską. Badania wykonano przy napięciu przyspieszającym 20000 eV, przy powiększeniu 500x. Badaniom punktowym poddano obszary od strony okostnej i śródkostnej.

W trakcie badania sekcyjnego pobierano także drugą kość piszczelową, którą po oczyszczeniu z tkanek miękkich i zważeniu poddano badaniom biomechanicznym w aparacie MTS Mini Bionix 858 przy prędkości obciążenia próbek 5 N/s. Na podstawie uzyskanych pomiarów wyznaczono moment maksymalnej siły. Pozwoliło to porównać właściwości mechaniczne kości piszczelowych kurcząt w zakresie zdolności do przenoszenia maksymalnych obciążeń.

### **Obliczenia statystyczne**

Na danych liczbowych uzyskanych w doświadczeniach, wykonywano obliczenia statystyczne. Wyniki obliczeń przedstawiono w tabelach. Przy porównaniu średnich uzyskanych z grup doświadczalnych ze średnimi z grup kontrolnych zastosowano test t Studenta. W tabelach, średnie doświadczalne oznaczano jedną lub dwoma gwiazdkami. Jeżeli średnie różniły się od siebie istotnie na poziomie ufności  $\alpha=0,05$  stawiano jedną gwiazdkę \*, a jeżeli różniły się na poziomie ufności  $\alpha=0,01$  stawiano dwie gwiazdki \*\*.

Dla lepszej przejrzystości, wyniki obliczeń przedstawiono również na wykresach (Ryc. 3, 4, 5, 6, 7), gdzie zaznaczono średnie i błędy standardowe średnich, zaznaczając u góry dla jakiego poziomu ufności te błędy były wyliczone.

## **WYNIKI**

### **Objawy kliniczne**

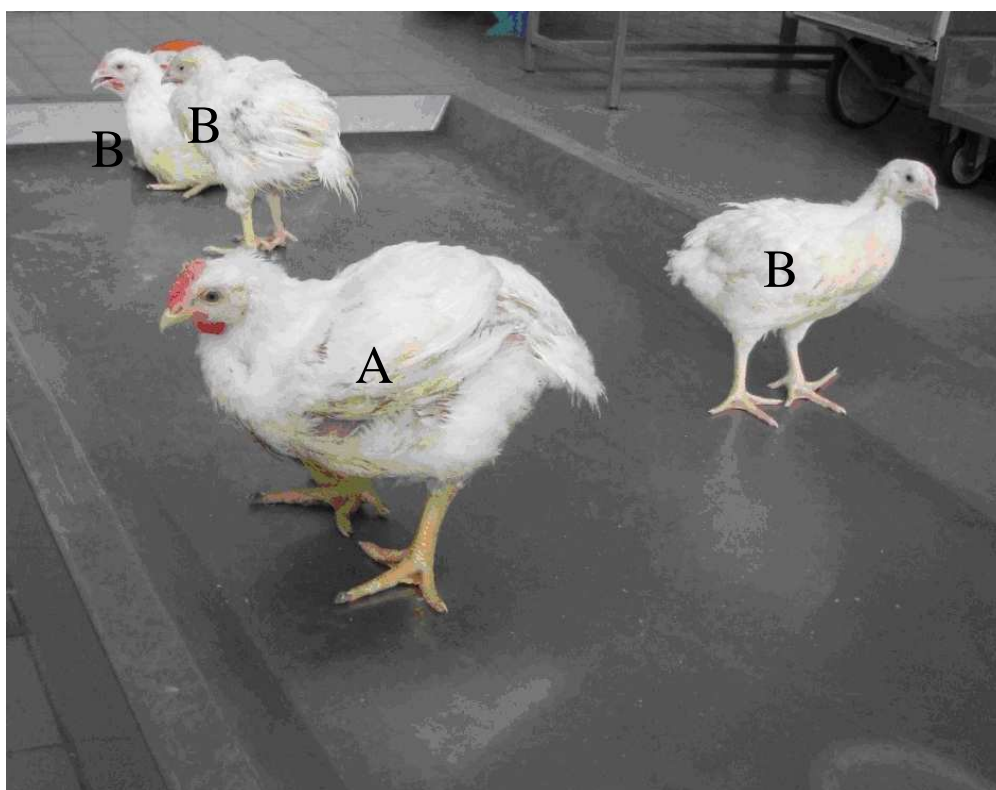
Począwszy od czwartego dnia doświadczenia w grupie ptaków doświadczalnych zauważono na ściółce ślady wodnistej, ciemno brązowej biegunki, która się stopniowo nasilała obejmując wszystkie ptaki grupy K-1 i K-2. Chore ptaki stały lub siedziały skulone z przymkniętymi oczami i nastroszonymi piórami nie wykazując chęci do ruchu. Obniżyło się także spożycie paszy i wody w porównaniu do ptaków kontrolnych. Powłoki skórne, grzebień i dzwonki oraz łuski śródstopia były wyraźnie blade (Ryc. 2). Średnia

masa ptaków w grupach doświadczalnych różniła się statystycznie w sposób istotny, od średniej masy w odpowiednich grupach kontrolnych.

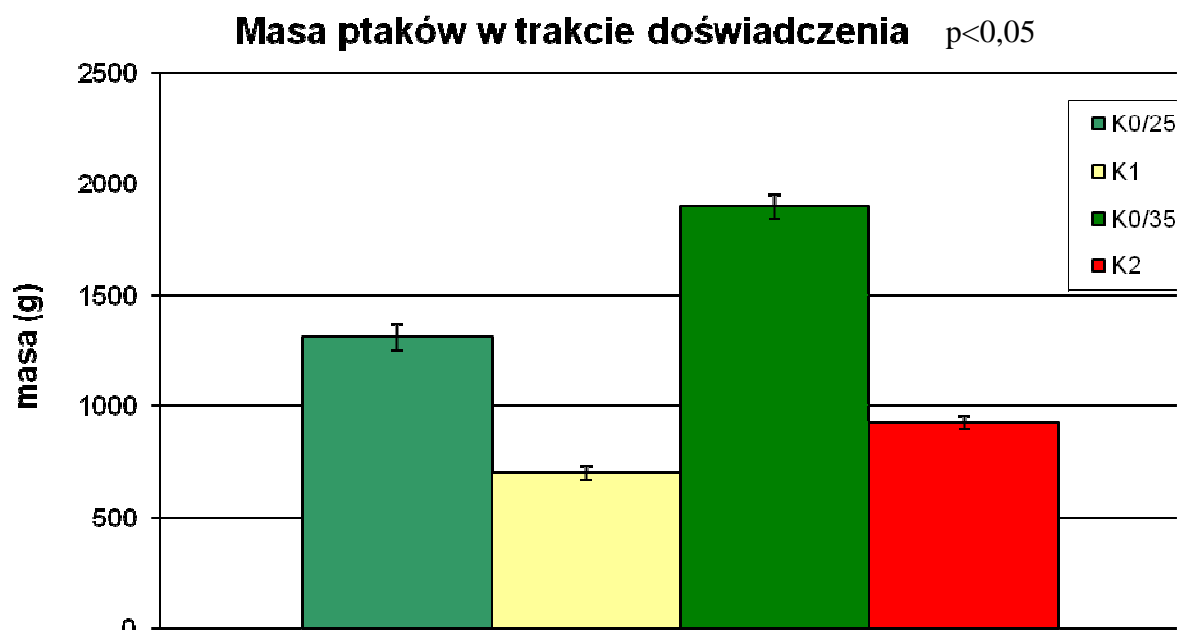
W przeprowadzonym doświadczeniu waga ptaków doświadczalnych z grupy K-1 w wieku 25 dni (czyli 10 dni po rozpoczęciu doświadczenia) była o 47% mniejsza niż kurcząt kontrolnych. W grupie K-2 tj. po 20 dniach doświadczenia waga ptaków była o 51% mniejsza niż kurcząt kontrolnych (Ryc. 3, Tab. 3).

Tab. 3. Średnia masa ptaków w trakcie doświadczenia

	K0 (25 dni)	K1	K0 (35 dni)	K2
Średnia	1307	696,6**	1895,8	923,9**
Błąd Standardowy (SD)	61,676	28,581	52,736	27,116
Odchylenie(SEM) Standardowe	137,913	90,383	117,922	85,750
Liczebnik (N)	5	10	5	10



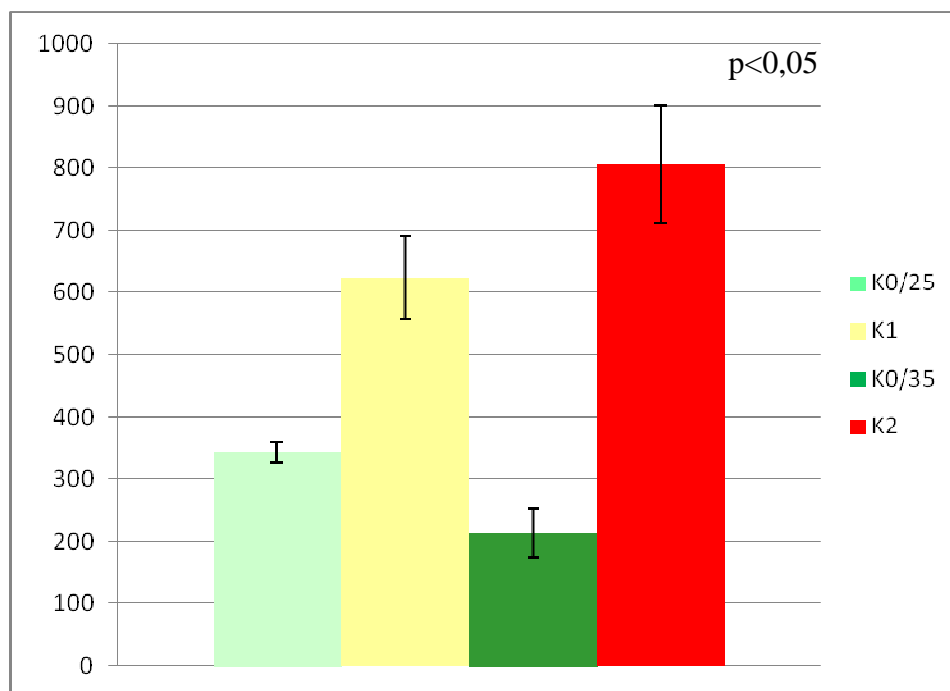
Ryc. 2. Wygląd kurcząt doświadczalnych (B) i kontrolnych (A) w 20 dniu doświadczenia.



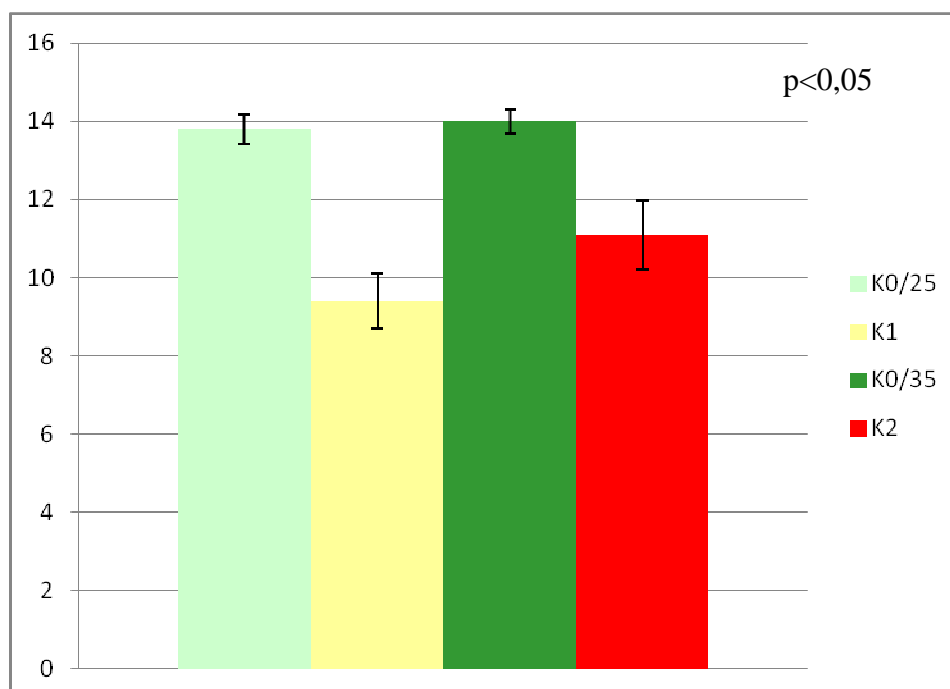
Ryc 3. Masa kurcząt w 10 i 20 dniu doświadczenia

Badania biochemiczne krwi wykazały, że stężenie albumin w surowicy kurcząt doświadczalnych grupy K-1 uległo zmniejszeniu o 31,89% w porównaniu do kurcząt kontrolnych K-0/25. Natomiast stężenie kreatyniny w surowicy kurcząt grupy K-1 uległo wzrostowi o 24,2%, a stężenie kwasu moczowego o 82,30% w porównaniu do kurcząt kontrolnych. Również aktywność fosfatazy alkalicznej w surowicy kurcząt grupy K-1 uległa zmniejszeniu o 58,3% w porównaniu do grupy kurcząt kontrolnych (Tab. 4 oraz Ryc. 4, 5, 6, 7).

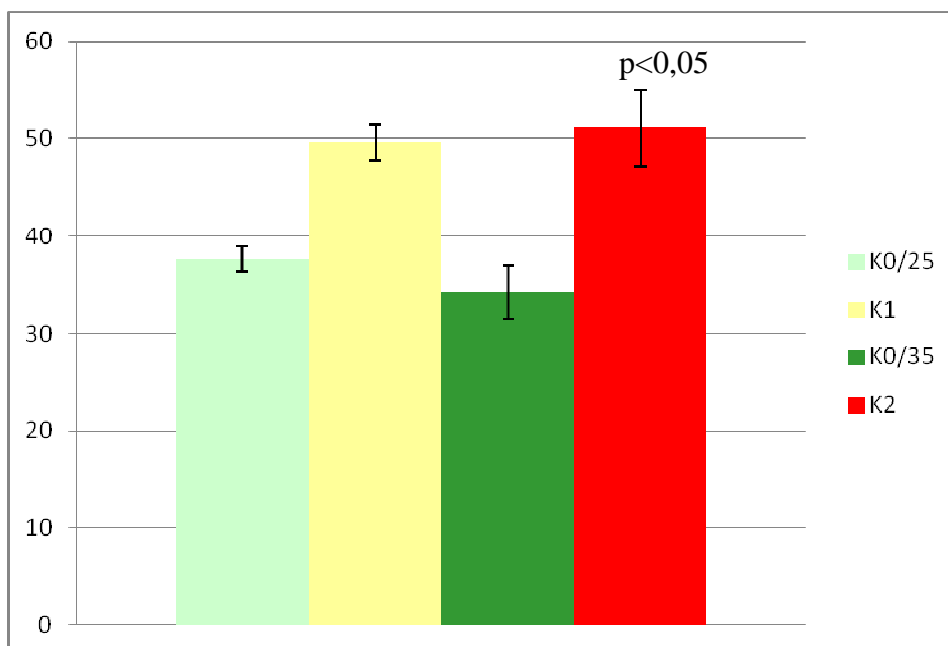
U kurcząt grupy K-2 poziom albumin uległ zmniejszeniu o 21% w porównaniu do kurcząt kontrolnych. Natomiast poziom kwasu moczowego uległ wzrostowi o 277%, a poziom kreatyniny o 49,4% w porównaniu do kurcząt kontrolnych. Poziom fosfatazy zasadowej kurcząt grupy K-2 uległ wzrostowi o 93,9% w porównaniu do kurcząt kontrolnych.



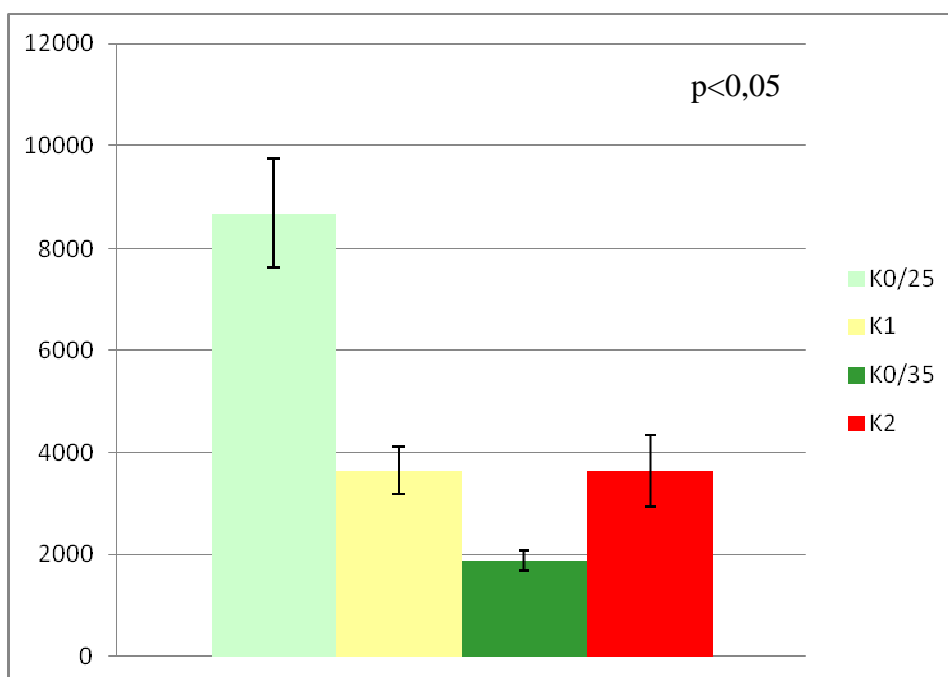
Ryc. 4. Stężenie kwasu moczowego w surowicy (µmol/l)



Ryc. 5. Stężenie albumin w surowicy krwi (g/l)



Ryc. 6. Stężenie kreatyniny w surowicy (µmol/l)



Ryc. 7. Aktywność fosfatazy zasadowej w surowicy (U/l)



Tab. 4. Wskaźniki statystyczne parametrów biochemicznych krwi

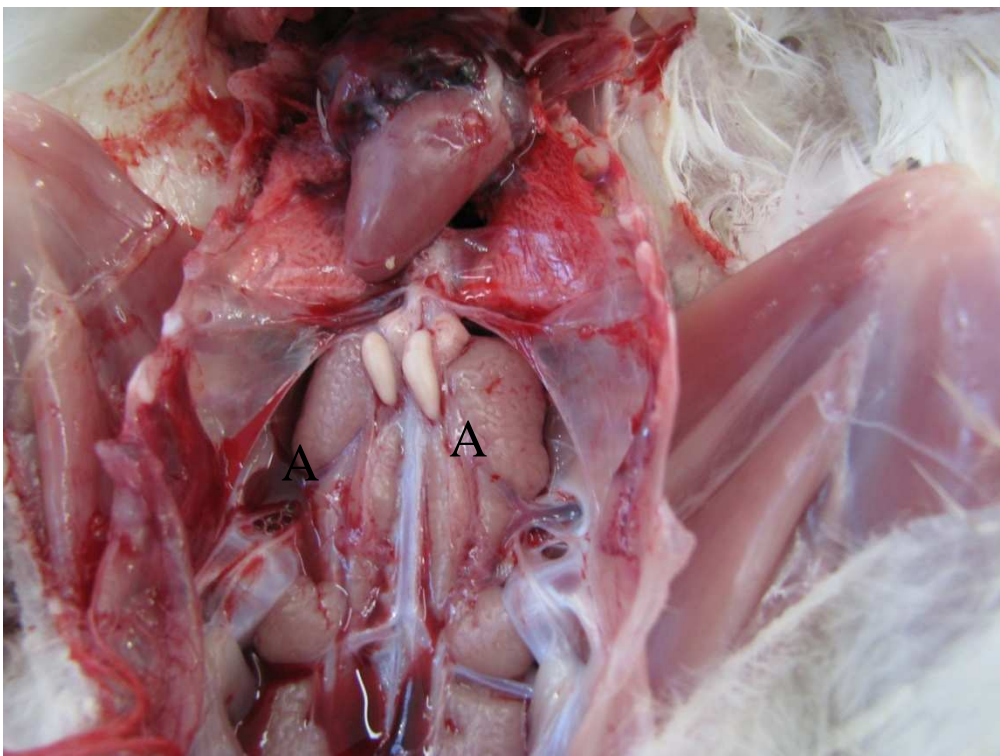
	<b>Kwas moczowy</b>				<b>Albuminy</b>			
	K0/25	K1	K0/35	K2	K0/25	K1	K0/35	K2
Średnia	342,2	624*	213,6	806,9**	13,8	9,4**	14,0	11,1
Błąd ( SD) Standardowy	39,65	68,053	37,993	95,904	0,374	0,707	0,305	0,887
Odchylenie Standardowe	88,65	215,203	84,954	302,329	0,837	0,966	1,581	2,806
Liczebność (N)	5	10	10	10	5	10	5	10
	<b>Kreatynina</b>				<b>Fosfatasa zasadowa</b>			
	K0/25	K1	K0/35	K2	K0/25	K1	K0/35	K2
Średnia	37,6	49,6**	34,2	51,1*	8688	3643**	1876	3638
Błąd ( SD) Standardowy	1,288	1,790	2,764	3,998	1060,62	468,000	202,62	708,773
Odchylenie Standardowe	2,88	5,66	6,181	12,644	2372,029	1479,94	453,078	2241,338
Liczebność (N)	5	10	5	10	5	10	5	10

### Zmiany sekcyjne

Kurczęta brojlery grup kontrolnych w badaniu sekcyjnym nie wykazywały widocznych odchyleń od stanu prawidłowego. Wielkość oraz ułożenie narządów wewnętrznych prawidłowe. Stan utrzymania i odżywiania dobry. Waga ptaków w stosunku do wieku prawidłowa.

U kurcząt doświadczalnych grupy K-1 stwierdzono silne zmniejszenie torby Fabrycjusza oraz śledziony. Nerki były powiększone i blade. Również wątroba była blada, kruchej konsystencji. Błona śluzowa jelit na całej długości blada, pokryta drobnymi wynacznieniami. W jelicie grubym stwierdzono znaczną ilość papkowatej treści. Kości śródstopia tych kurcząt były mniejsze w porównaniu do kurcząt kontrolnych.

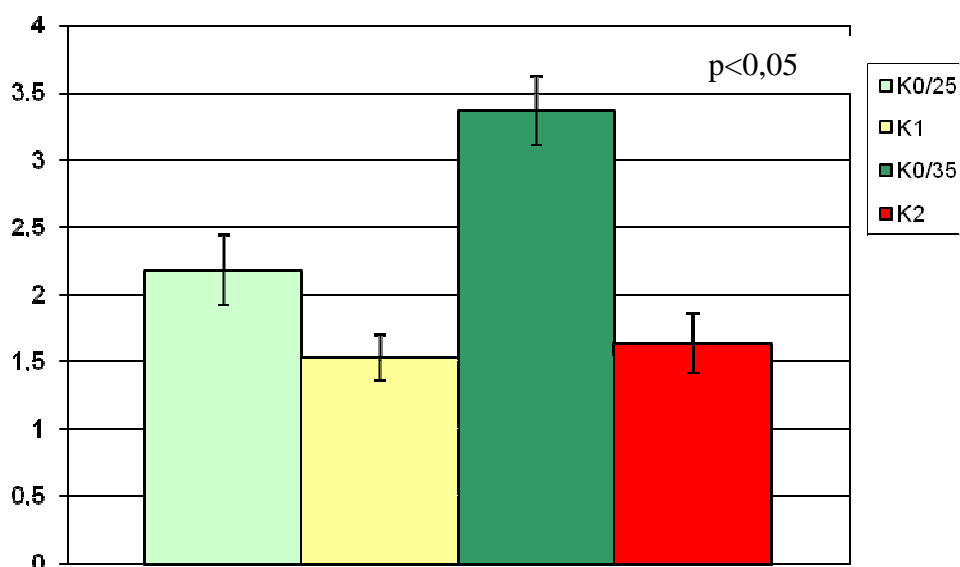
U ptaków grupy K-2 zmiany patologiczne były bardziej nasilone niż u kurcząt grupy K-1. Nerki wszystkich kurcząt były silne powiększone i blade (Ryc. 8).



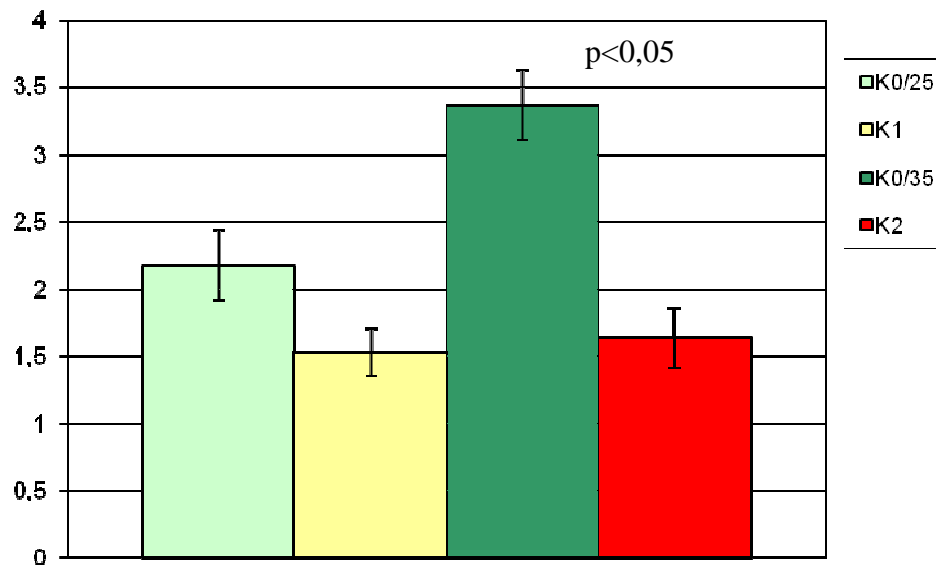
Ryc. 8. Silne powiększenie i bladeści nerek (A) kurcząt doświadczalnych (K-2).

Podobnie wątroba była krucha i blada. Pomniejszenie torby Fabrycjusza i śledziony było bardziej widoczne niż w grupie K-1. Żołądek mięśniowy był prawie pusty. Żołądek gruczołowy w obu grupach doświadczalnych nie wykazywał odchyleń od stanu prawidłowego. Błona śluzowa jelit na całej długości blada, miejscami przekrwiona, pokryta zielonkawą śluzową treścią. Kości śródstopia były wyraźnie mniejsze zarówno

w porównaniu do kurcząt grupy K-0/35 jak i K-1. Obliczenia statystyczne wykazały, że zarówno średnie masy torby Fabrycjusza jak i śledziona w grupach K-1, K-2 różniły się istotnie od odpowiednich mas w grupie kontrolnej K-0/25 i K-0/35. W omawianym doświadczeniu masa torby Fabrycjusza ptaków doświadczalnych grupy K-1 tj. 10 dni po rozpoczęciu doświadczenia była o 30 % mniejsza niż u kurcząt kontrolnych. Natomiast u kurcząt doświadczalnych grupy K-2 masa torby Fabrycjusza uległa zmniejszeniu o 53 % w porównaniu do kurcząt kontrolnych. Masa śledziona kurcząt doświadczalnych grupy K-1 była o 53% mniejsza, a kurcząt grupy K-2 o 52% mniejsza niż kurcząt kontrolnych (Tab. 5, 6, i Ryc. 9 i 10).



Ryc. 9. Średnia masa torby Fabrycjusza.



Ryc. 10 Średnia masy śledziony

Tab. 5. Masa torby Fabrycjusza

	K0/25	K1	K0/35	K2
Średnia	2,178	1,677	3,362	1,579**
Błąd (SD) Standardowy	0,156	0,173	0,324	0,226
Odchylenie Standardowe (SEM)	0,349	0,549	0,725	0,7157
Liczebność (N)	5	10	5	10

Tab. 6. Masa śledziony

	K0/25	K1	K0/35	K2
Średnia	1,532	0,711**	1,958	0,935**
Błąd (SD) Standardowy	0,131	0,031	0,140	0,082
Odchylenie Standardowe (SEM)	0,293	0,101	0,313	0,262
Liczebność (N)	5	10	5	10

W badaniu morfometrycznym kości oceniano:

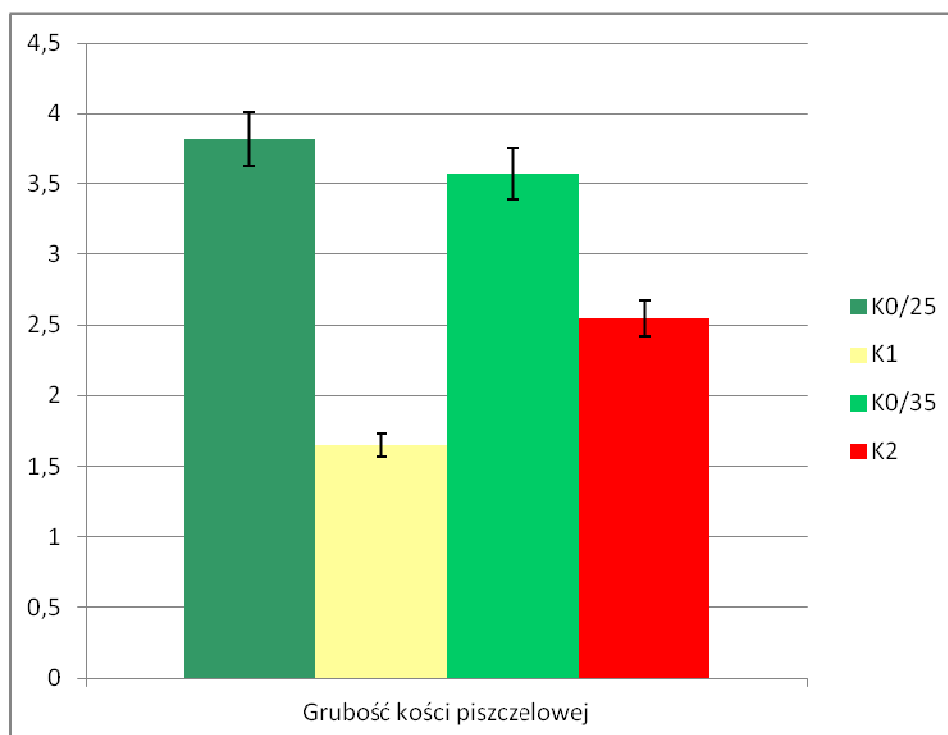
1. Średnicę zewnętrzną kości piszczelowej mierzoną w części środkowej wyznaczanej na podstawie odległości do końca bliższego i dalszego.

2. Średnicę wewnętrzną, mierzoną w tym samym miejscu, wyznaczającą grubość jamy szpikowej
3. Stopień porowatości kości, będący informacją dotyczącą ilości wolnych przestrzeni pomiędzy beleczkami pierwotnej tkanki kostnej od strony okostnej i srodkostnej
4. Objętość kości

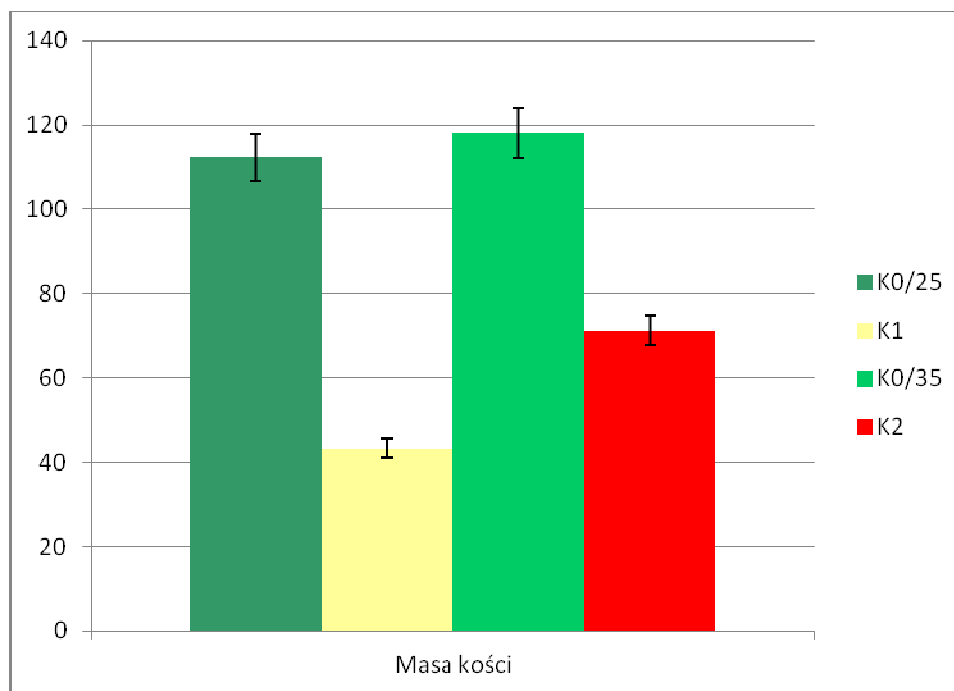
Wyniki badań morfometrycznych zostały przedstawione w tabeli 7 oraz na rycinach 11-13.

Tablica 7. Wyniki analizy morfometrycznej kości badanych zwierząt

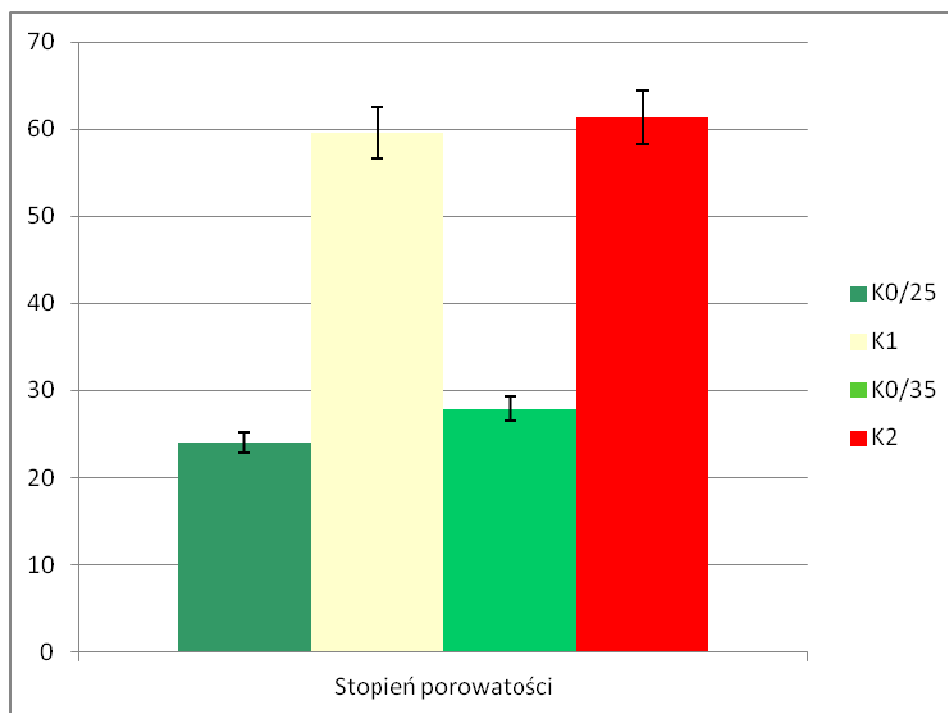
	średnica zewnętrzna	SD	średnica wewnętrzna	SD	grubość ściany	SD	masa kości (g)	SD	stopień porowatości - okostna %	SD	stopień porowatości - srodkostna %	SD
K0/25	6,593	0,29	2,776	0,73	3,817	0,48	11,2291	0,521	23,980	2,03	0	
K1	5,004	0,16	3,354	0,29	1,650	0,29	4,3303	0,647	59,600	3,5	0	
K0/35	7,048	0,31	3,471	0,56	3,577	0,4	11,8157	0,916	27,880	3,55	37,380	2,65
K2	5,723	0,24	3,174	0,34	2,549	0,37	7,1210	0,971	61,320	4,36	68,480	3,51



Ryc. 11. Grubość ściany kości piszczelowej (mm). ( $p < 0,05$ )

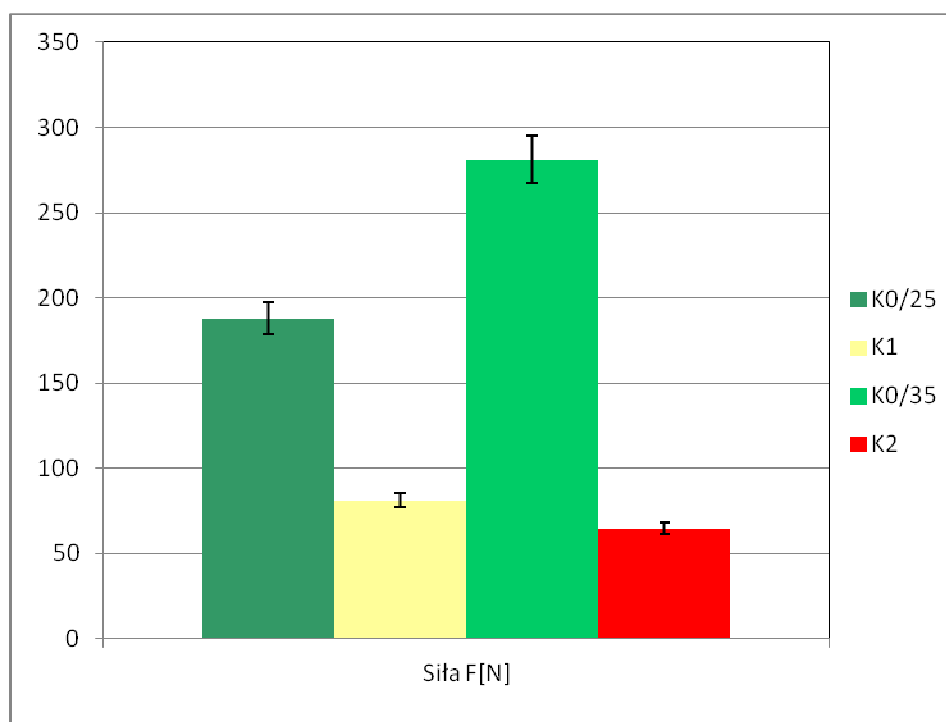


Ryc. 12. Masa kości piszczelowej kurcząt (w gramach). ( $p < 0,05$ ).

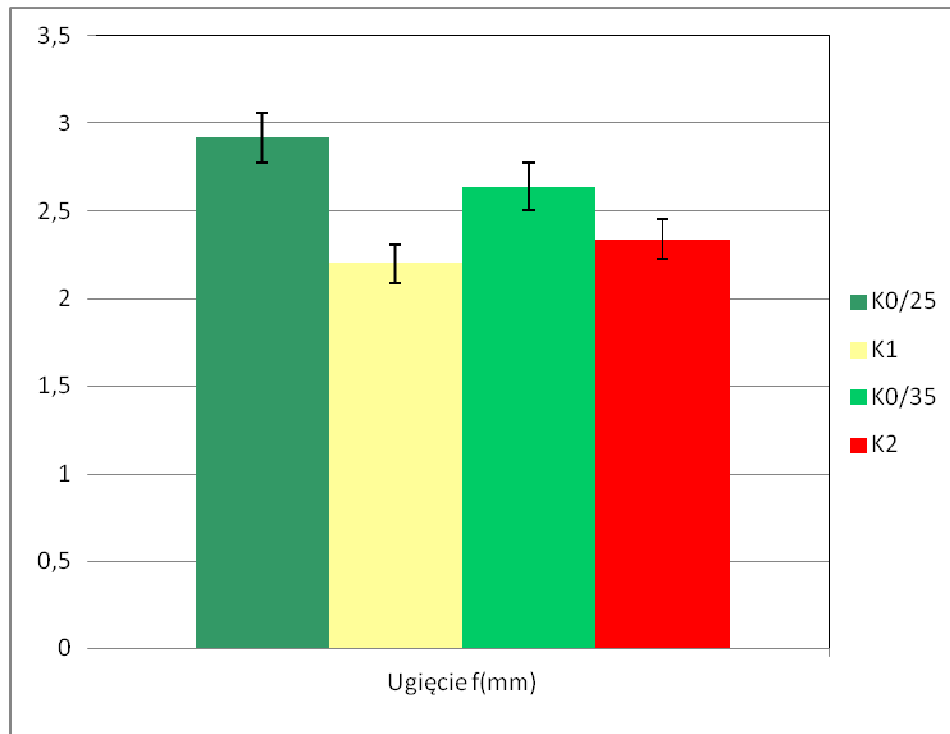


Ryc. 13. Stopień porowatości kości piszczelowej kurcząt. ( $p < 0,05$ ).

Wyniki pomiarów średnicy kości piszczelowej oraz stopnia jej porowatości wskazują na wyraźne zatrzymanie syntezy tkanki kostnej w grupie eksperymentalnej po 10 dniach podawania ochratoksyny. W kolejnych dniach synteza kości uległa wznowieniu, ale przy wzrastającej masie kostnej dochodzi do pozornego wzrostu gęstości kości, co przejawia się mniejszym stopniem porowatości. Współczynnik ten ulega obniżeniu w grupie eksperymentalnej co oznacza, że pomimo wznowienia syntezy tkanki kostnej, nie jest ona na tyle silna aby utrzymać ciężar ptaka. Konsekwencją jest odkształcanie się kości oraz zmniejszenie objętości jamy szpikowej. W badaniu biomechanicznym wykazano, że kości ptaków grupy eksperymentalnej są mniej sztywne, czyli łatwiej ulegają odkształceniom. Jest to spowodowane zróżnicowaną masą kości jak i różnym stopniem jej mineralizacji (Ryc. 14 i 15).



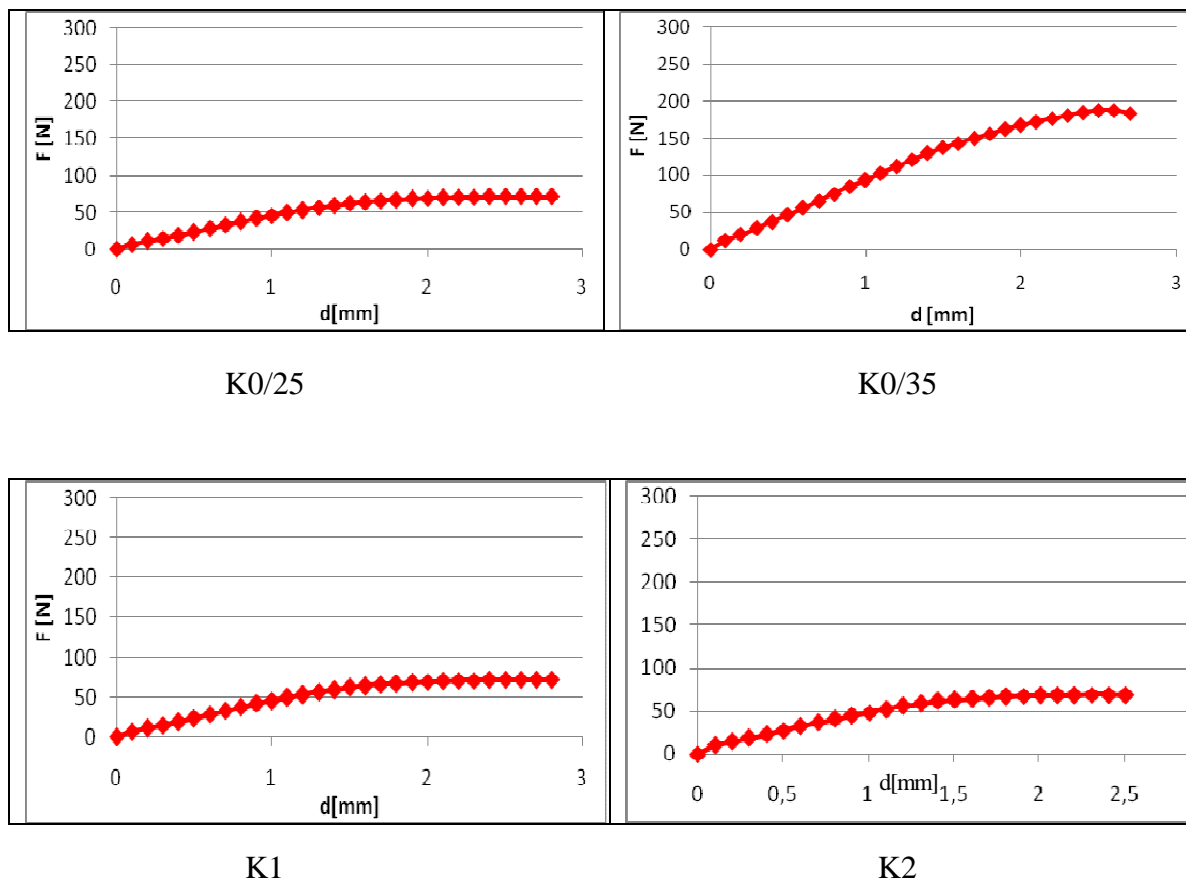
Ryc. 14. Średnie wartości siły przenoszonej przez kości piszczelowej ( $p < 0,05$ )



Ryc. 15. Średnie wartości ugięcia kości piszczelowej ( $p < 0,05$ )

Ugięcie wraz ze spadkiem zdolności do przenoszenia obciążeń wskazuje na utratę lub brak właściwej struktury tkanki kostnej oraz wciąż niedostateczny stopień jej mineralizacji. Maksymalne wartości przenoszenia siły dla ptaków grupy kontrolnej w 25 i 35 dniu życia tj. w 10 i 20 dniu doświadczenia wynoszą odpowiednio 188,02 N i 281,12 N natomiast dla ptaków grupy eksperymentalnej 81,26 N i 64,84 N. Oznacza to, że zdolność do przenoszenia obciążeń przez kości piszczelowe ulega znacznemu obniżeniu po podaniu ochratoksyny. W związku z osłabionym procesem osteogenezy, zaburzoną mikroarchitekturą kości oraz słabą mineralizacją dochodzi do wyraźnego zwiększenia elastyczności kości u ptaków z grupy eksperymentalnej. Uzyskane wstępne wartości są charakterystyczne dla kości pierwotnej, która w obu grupach ulega resorpcji (Ryc. 39, 41). Brak lub osłabienie osteogenezy odokostnowej w grupach eksperymentalnych doprowadza do istotnych zmian we właściwościach mechanicznych kości. Porównując zdolność do odkształcenia pod wpływem obciążenia wartości te są wyższe dla grup kontrolnych (2,92 mm i 2,64 mm). Wyznaczony przez nie kierunek spadkowy oznacza wzrost sztywności kości ptaków grupy kontrolnej. Grupy eksperymentalne nie tylko słabiej przenoszą obciążenia ale również wykazują tendencje odwrotne w zakresie ugięcia (2,2 mm i 2,34 mm) (Ryc. 16).





Ryc. 16. Wykres odkształceń badanych kości piszczelowych w odniesieniu do siły w grupie kontrolnej i eksperymentalnej w 10 i 20 dniu eksperymentu.

Krzywa w odniesieniu do siły jest płaska dla kości elastycznych, natomiast dla kości sztywnych jest pionowa.

Na wykresach tych uwzględniono moment maksymalnej siły działającej na kość, powyżej której dochodzi do odkształceń plastycznych. Często w takim przypadku, dochodzi do złamania elastycznego, gdzie po przejściu przez punkt maksimum, kości ulegają powolnemu odkształceniu pod wpływem mniejszych sił. Oznacza to stopniowe, wielokrotne „pęknięcia” z których każde pęknięcie osłabia kość. Stąd wartości niezbędne do dalszego przełamania kości są coraz mniejsze.

### Badania histopatologiczne

W preparatach histologicznych jelita czczego kurcząt kontrolnych kosmki jelitowe były smukłe, regularnego palczastego kształtu (Ryc. 17). W prawidłowym cylindrycznym nabłonku kosmków obecne były nieliczne komórki kubkowe oraz średnio liczne migrujące limfocyty. Średnia wysokość kosmków u ptaków grupy KO/25 i KO/35 wynosiła odpowiednio 1,27 i 1,19 mm, a głębokość krypt 0,347 i 0,23 mm (Tab. 8). U ptaków otrzymujących przez 10 dni ochratoksynę A (K-1) zarówno kosmki jak i krypty uległy niewielkiemu skróceniu. Kosmki miały 1,12 mm, a krypty 0,26 mm długości (Ryc. 18, Tab. 8). Kosmki pozostawały wciąż smukłego kształtu jednak na ich powierzchni widoczne były wrębiaste wgłębienia. Wzmozona była także liczba komórek kubkowych. Natomiast zręb kosmków podobnie jak liczba intraepitelialnych limfocytów utrzymywała się na poziomie grupy kontrolnej. U ptaków otrzymujących ochratoksynę przez 20 dni (K-2) kosmki były wyraźnie skrócone (1,03mm) i poszerzone, miejscami zlewając się ze sobą w mało foremne struktury o nierównej wrębiastej powierzchni (Ryc. 19). W nabłonku kosmków liczne były komórki kubkowe. Nieznacznie wzmozona była także liczba śródnabłonkowych limfocytów. Skróceniu uległy krypty jelitowe (0,18 mm). U części ptaków obserwowano nacieki zapalne szczególnie w przypodstawnych obszarach błony śluzowej z formowaniem torbielowatych struktur w kryptach (Tab. 9 i 10, Ryc. 20, 22).

Tab. 8. Pomiary kosmków i krypt jelita czczego i biodrowego

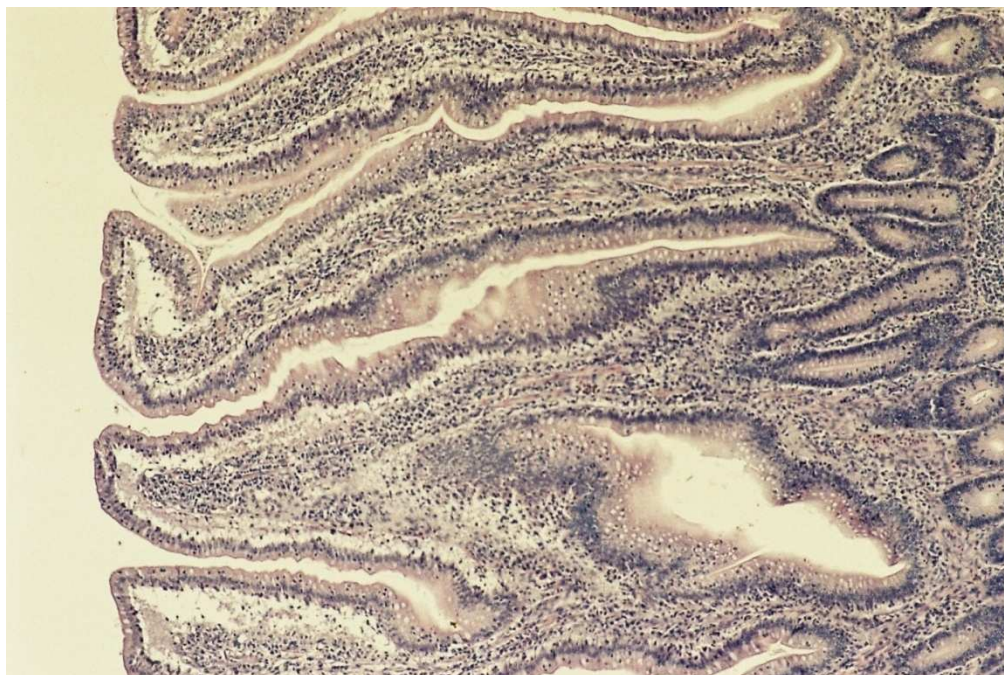
Grupa kurcząt	Średnia długość kosmków jelita czczego	Średnia długość kosmków jelita biodrowego	Średnia długość krypty jelitowej jelita czczego	Średnia długość krypty jelitowej jelita biodrowego
	[mm]			
KO/25	1,27	0,736	0,347	0,25
K1	1,129	0,73	0,26	0,19
KO/35	1,19	0,817	0,23	0,20
K2	1,038	0,63	0,18	0,13



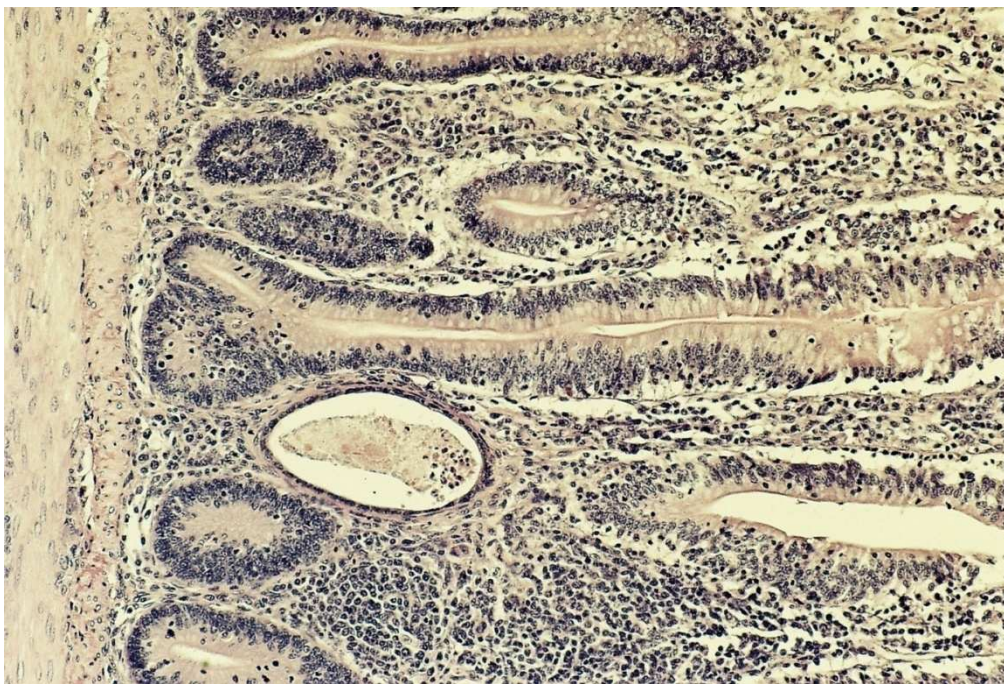
Ryc. 17. Kosmki jelita czczego kurcząt kontrolnych (K-0). Prawidłowo ukształtowane, smukłe, palczaste kosmki. H&E. Pow. x100



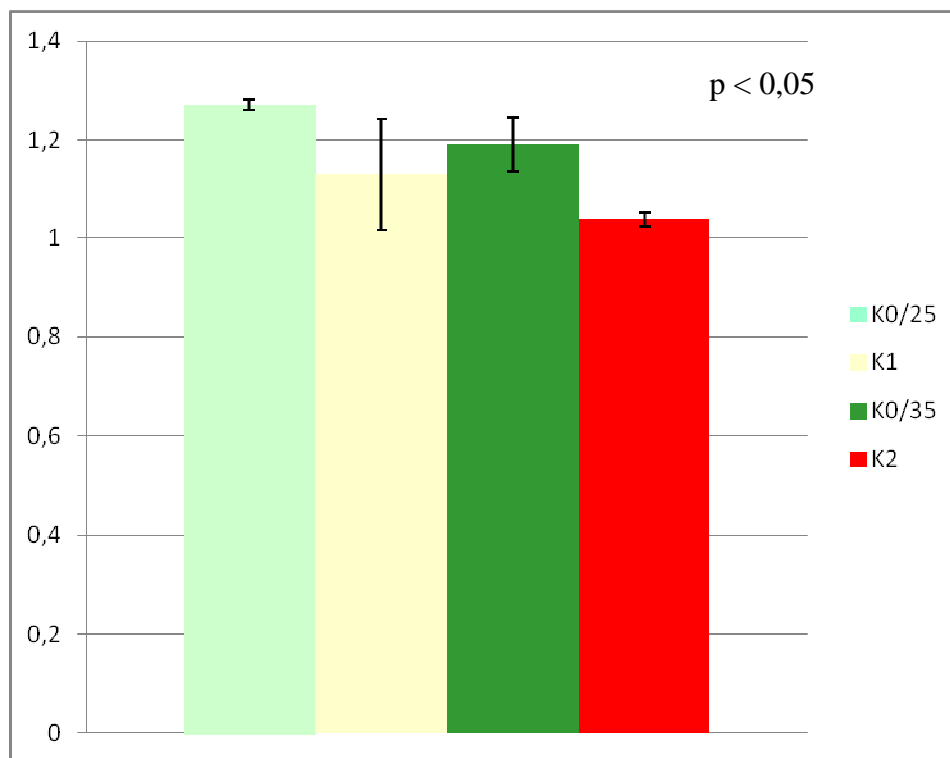
Ryc. 18. Kosmki jelita czczego kurcząt doświadczalnych (K-1). Niewielkie skrócenie i wrębiasta powierzchnia kosmków. H&E. pow. x 100



Ryc. 19. Błona śluzowa jelita czczego kurcząt doświadczalnych (K2). Znaczne skrócenie i deformacja kosmków. H&E. pow. x 100



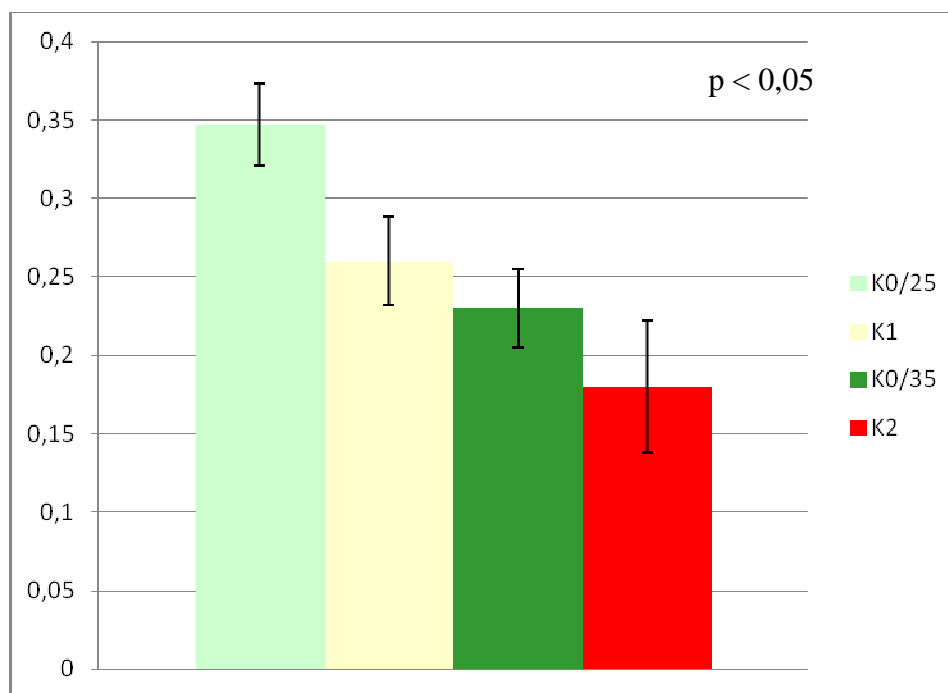
Ryc. 20. Błona śluzowa jelita czczego kurcząt doświadczalnych (K2). Torbielowate poszerzenie krypt wypełnionych detrytus oraz masywne nacieki zapalne w zrębie mezenchymalnym. H&E. pow. x 200



Ryc 21. Średnia długość kosmków jelita czczego kurcząt

Tab. 9. Średnia długości kosmków jelita czczego

	K0/25	K1	K0/35	K2
Średnia	1,27	0,624**	1,19	0,612**
Błąd standardowy	0,056	0,035	0,117	0,047
Odchylenie Standardowe	0,126	0,113	0,262	0,142
Liczebność	5	10	5	9



Ryc. 22 Średnia długość krypt jelita czczego kurcząt.

Tab. 10. Średnia długość krypt jelita czczego

	<b>K-0/25</b>	<b>K-1</b>	<b>K-0/35</b>	<b>K-2</b>
Średnia	0,347	0,141**	0,23	0,117**
Błąd Standardowy	0,05	0,009	0,018	0,014
Odchylenie Standardowe	0,114	0,028	0,04	0,042
Liczebność	5	10	5	9

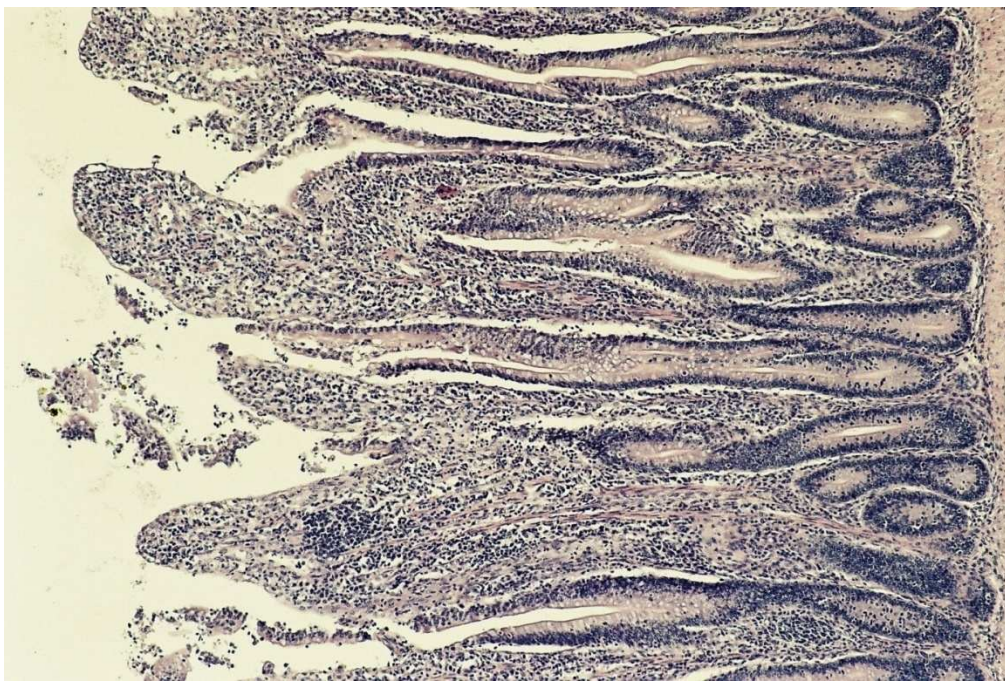
Z obliczeń statystycznych wynika, że średnia długości kosmków jelita czczego:

- w grupie K1 nie różniła się istotnie od średniej grupy K0,
- w grupie K2 różniła się istotnie na poziomie  $\alpha=0,05$ .

W jelicie biodrowym kosmki są fizjologiczne krótsze niż w jelicie czczym. W grupie ptaków kontrolnych średnia długość kosmków wynosiła 0,78 mm przy czym nie miały one tak smukłego wyglądu jak w jelicie czczym. W nabłonku liczne były komórki kubkowe oraz średnio liczne migrujące limfocyty (Ryc. 21, 23). Krypty drobne głębokości 0,22 mm (Ryc. 22), a zrąb mezenchymalny prawidłowo wykształcony.

U ptaków grupy doświadczalnej K-1 kosmki były nieznacznie tylko skrócone (0,73 mm) i uzyskiwały bardziej liściasty kształt wynikający z ich pogrubienia i nierównej wrębiastej powierzchni. Wzmozżona była także liczba komórek zrębu mezenchymalnego. W

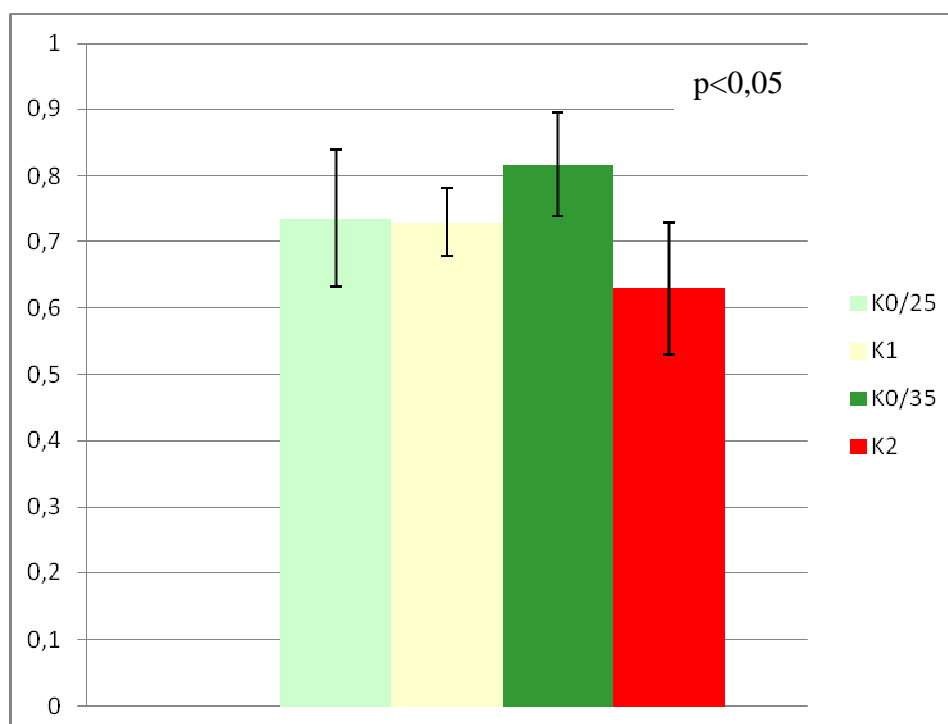
nabłonku kosmków bardzo liczne komórki kubkowe i średnio liczne migrujące przez nabłonek limfocyty. Nieznacznie skrócone były także krypty jelitowe (0,19 mm). Ptaki doświadczalne K-2 przedstawiały podobny obraz jelita biodrowego jak w grupie K1 jednak nieco bardziej nasilone było skrócenie kosmków (0,63 mm) i krypt (0,13 mm) (Ryc. 24, 25, 26, Tab. 8, 9). Z obliczeń statystycznych wynika, że średnie długości kosmków w jelicie biodrowym nie różniły się istotnie między sobą w grupach K-0, K-1, K-2. Podobnie średnie długości krypt jelita biodrowego nie różniły się między sobą istotnie.



Ryc. 23. Błona śluzowa jelita biodrowego kurcząt doświadczalnych (K-1). Znaczne skrócenie i deformacja i kosmków oraz nacieki zapalne zrębu mezenchymalnego. H-E, pow. x 100



Ryc. 24. Błona śluzowa jelita biodrowego kurcząt doświadczalnych (K-2). Skrócenie kosmków i znaczne wzmożenie liczby komórek kubkowych. H-E. Pow. x100

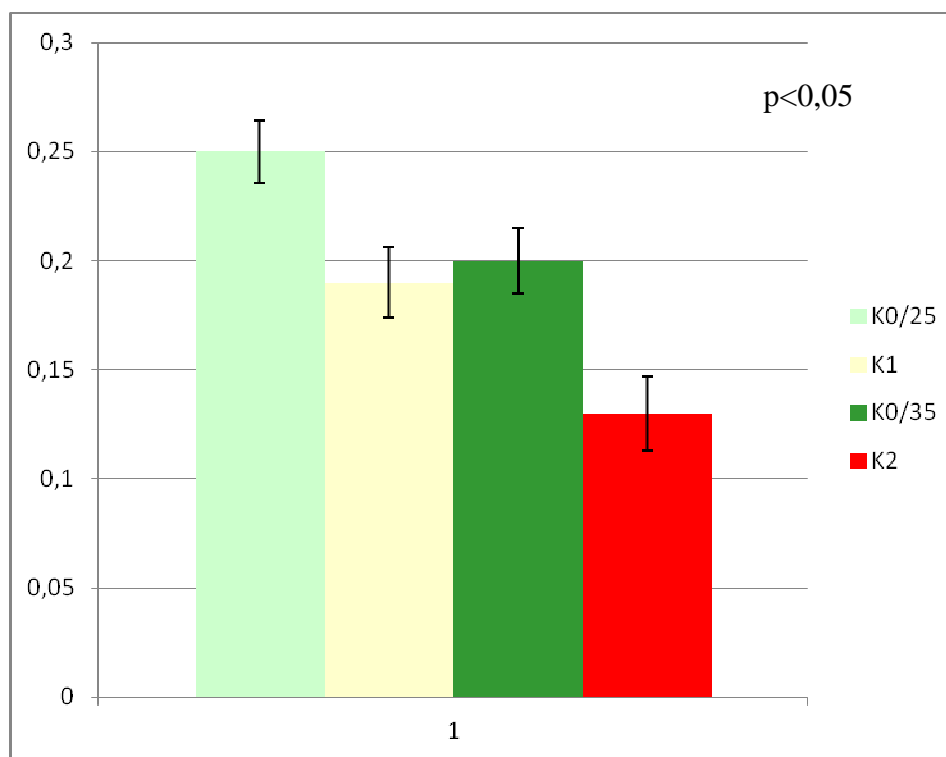


Ryc. 25. Średnia długość kosmków jelita biodrowego.



Tab. 11. Średnia długość kosmków jelita biodrowego.

	K-0/25	K-1	K-0/35	K-2
Średnia	0,736	0,379**	0,817	0,412**
Błąd standardowy	0,039	0,016	0,045	0,031
Odchylenie Standardowe	0,087	0,051	0,101	0,098
Liczebność	5	10	5	10

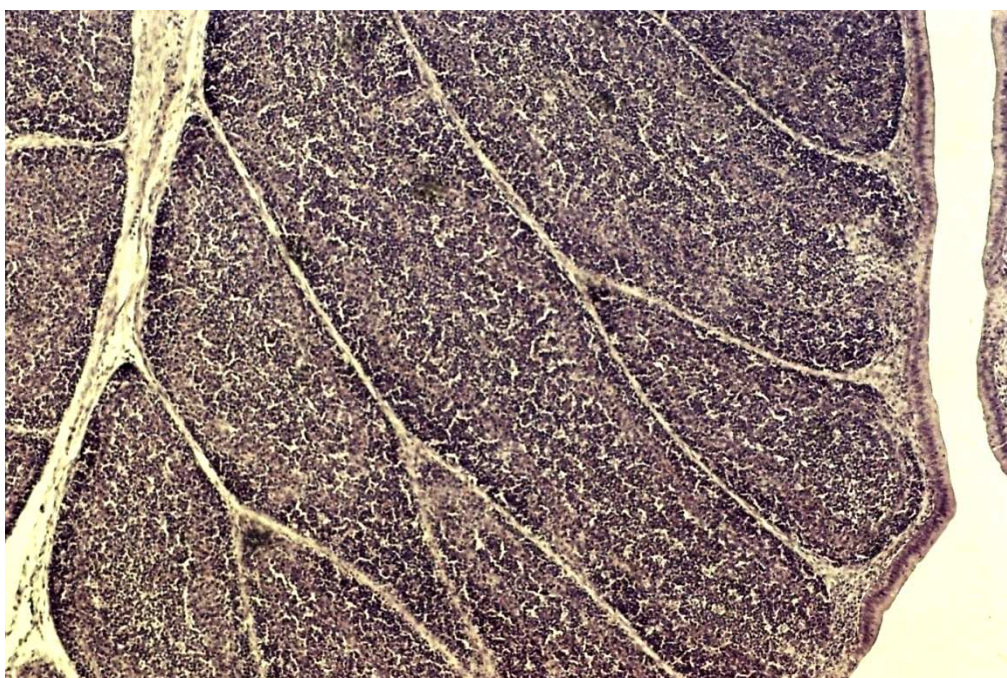


Ryc 26 Średnia długość krypt jelita biodrowego.

Tab. 12. Średnia długość krypt jelita biodrowego.

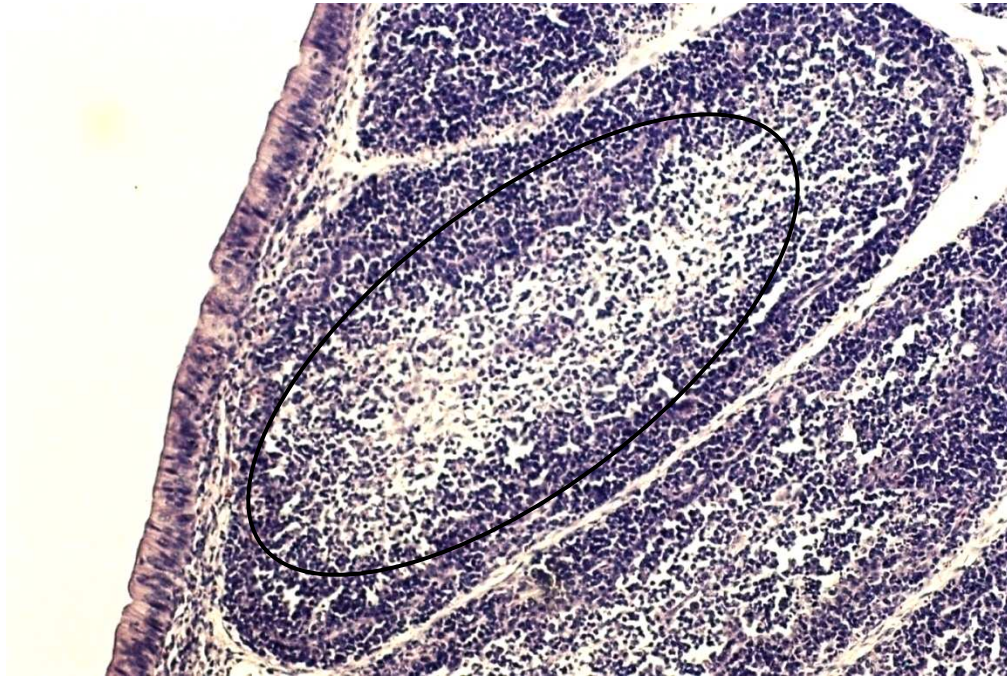
	K-0/25	K-1	K-0/35	K-2
Średnia	0,255	0,092**	0,20	0,091**
Błąd Standardowy	0,028	0,0051	0,024	0,0056
Odchylenie Standardowe	0,063	0,016	0,054	0,017
Liczebność	5	10	5	10

Obraz mikroskopowy torby Fabrycjusza kurcząt grupy kontrolnej (K-0) przedstawiał prawidłową budowę histologiczną. Grudki chłonne odpowiedniej wielkości i kształtu zbudowane z gęsto ułożonych limfocytów. Poszczególne grudki oddzielone są wąskimi pasemkami śródmiąższowej tkanki łącznej. Fałdy torby Fabrycjusza pokrywa regularny, dobrze zachowany nabłonek pryzmatyczny (Ryc. 27).



Ryc. 27. Torba Fabrycjusza kurcząt grupy K-0 przedstawia prawidłową strukturę histologiczną. H-E. Pow. x 200

U kurcząt doświadczalnych grupy K-1 stwierdzono w centralnych obszarach zanik limfocytów z tendencją do rozszerzania w kierunku obwodowym. Tkanka łączna pomiędzy grudkami przedstawiała cechy umiarkowanego obrzęku. (Ryc. 28).

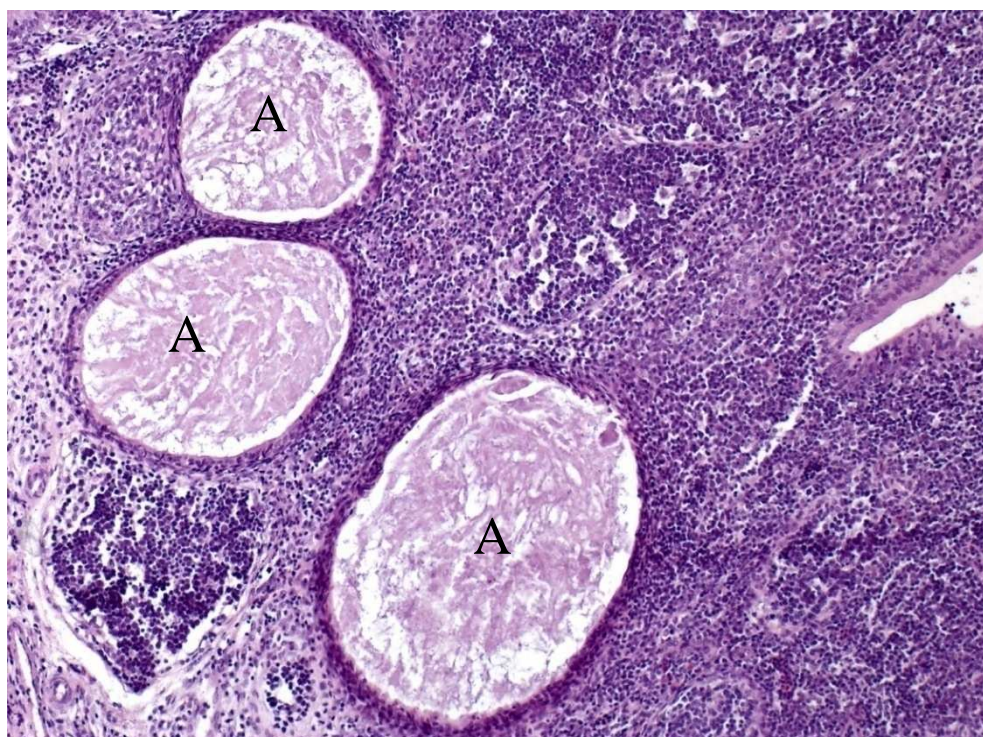


Ryc. 28. Torba Fabrycjusza kurcząt grupy K-1. Wyraźnie widoczna deplecja limfocytów w centrum grudek chłonnych. H-E. Pow. X 200.

Grudki chłonne torby Fabrycjusza kurcząt doświadczalnych grupy K-1 były mniejsze niż u zwierząt kontrolnych. Znacznemu zmniejszeniu uległa również liczba znajdujących się w nich limfocytów. Na obwodzie grudek chłonnych pojawiają się niewielkie nacieki zapalne ze znacznym odsetkiem heterofilów (Ryc. 28). U kurcząt doświadczalnych (grupy K-2) w centrum grudek zaznacza się silny zanik utkania limfatycznego obejmujący stopniowo także obszary obwodowe. W centrum grudek u 1/3 badanych ptaków formowały się torbielowate struktury wypełnione kwaśnymi mukopolisacharydami (Ryc.30). U kurcząt (grupy K-2) utkanie limfatyczne grudek chłonnych wykazywało silniejszy stopień zaniku niż w grupie K-1 (Tab. 13) (Ryc. 29). Również tkanka łączna otaczająca grudki chłonne jest bardziej obrzękła (Ryc. 30).



Ryc. 29. Torba Fabrycjusza kurcząt grupy K-2. W centrum grudek chłonnych widoczna nasilona apoptoza limfocytów. H-E. Pow. X 200.

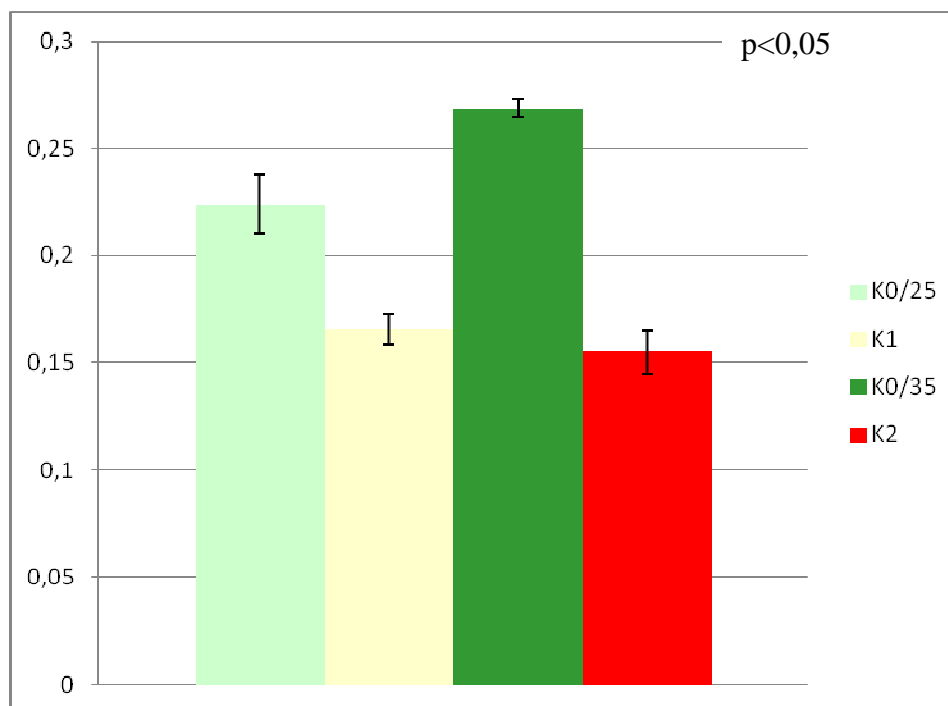


Ryc. 30. Torba Fabrycjusza kurcząt grupy K-2. W grudkach widoczne torbielowate struktury (A) wypełnione kwaśnymi mukopolisacharydami. Pow. x 200.

Tabela 13. Średnie wymiary grudek chłonnych kurcząt grup K-0, K-1 oraz K-2

	średnie długości grudek chłonnych			średnie szerokości grudek chłonnych			średnia powierzchnia grudek chłonnych <sup>2</sup>		
	K-0/25 K-0/35	K-1	K-2	K-0/25 K-0/35	K-1	K-2	K-0/25 K-0/35	K-1	K-2
1- K-0/25	0,752	0,688	0,57	0,33	0,26	0,22	<b>0,224</b> <b>0,269</b>	<b>0,166</b>	<b>0,155</b>
2	0,81	0,725	0,7	0,35	0,35	0,3			
3	0,915	0,77	0,67	0,3	0,32	0,42			
4	0,887	0,77	0,52	0,32	0,34	0,23			
5	0,915	0,76	0,52	0,37	0,22	0,28			
6-K-0/35	1,1	0,79	0,67	0,36	0,4	0,3			
7	1,13	0,626	0,55	0,37	0,29	0,32			
8	1,12	0,62	0,78	0,43	0,26	0,31			
9	1	0,67	0,71	0,44	0,31	0,31			
10	0,8	0,6	0,8	0,36	0,27	0,35			
Średnia	<b>0,8558</b> <b>1,0108</b>	<b>0,702**</b>	<b>0,649**</b>	<b>0,334</b> <b>0,388</b>	<b>0,302*</b>	<b>0,304*</b>			
Odchylenie Standardowe	<b>0,125</b> <b>0,137</b>	<b>0,07</b>	<b>0,1035</b>	<b>0,0442</b> <b>0,0387</b>	<b>0,0528</b>	<b>0,0568</b>			

<sup>2</sup> pole powierzchni wyznaczono ze wzoru: długość grudek/2 · szerokość grudek/2 · π



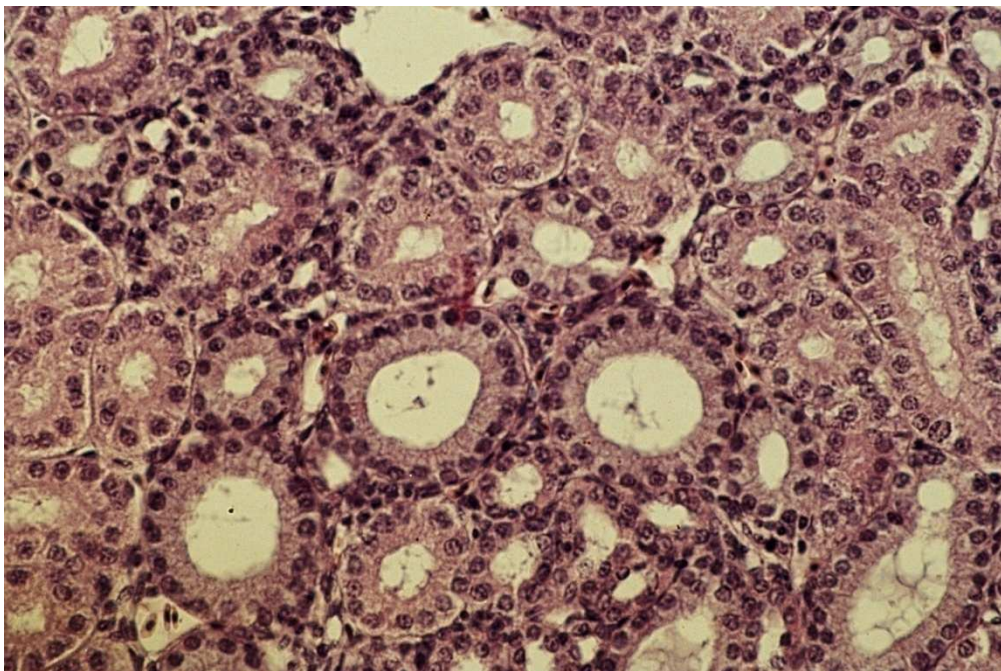
Ryc. 31. Średnia wielkość grudek chłonnych torby Fabrycjusza ptaków (mm<sup>2</sup>)

U ptaków kontrolnych struktura śledziony wykazuje prawidłową budowę histopatologiczną. Zarówno ilość jak i wielkość grudek chłonnych śledzionowych jest zachowana.

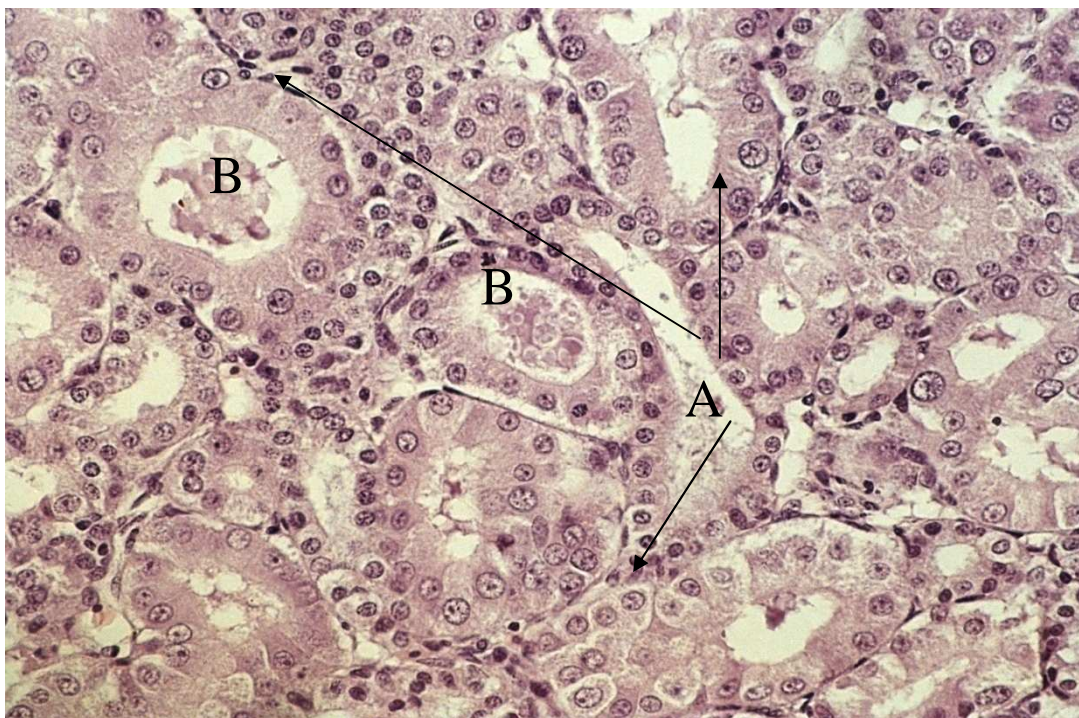
U kurcząt doświadczalnych grupy K-1 nie zauważono wyraźnych zmian histopatologicznych. Natomiast u kurcząt doświadczalnych grupy K-2 widoczny był umiarkowany zanik komórek limfocytarnych na obwodzie grudek chłonnych postępujący w kierunku centrum grudki. Grudki chłonne uzyskują często nieregularny kształt. Miejscami obserwuje się rozrzedzenie i zanik tkanki limfatycznej.

W nerkach kurcząt obu grup kontrolnych nie stwierdzono zmian histopatologicznych. Struktura histologiczna kanalików nerkowych zachowana (Ryc. 32). U kur doświadczalnych grupy K-1 nabłonki kanalików nerkowych były obrzmiałe powodując zmniejszenie światła kanalików. W świetle kanalików nerkowych miejscami stwierdzono obecności wałeczków białkowych lub złuszczonego nabłonka (Ryc. 33). W tkance śródmiąższowej obserwuje się nacieki komórek zapalnych złożone z limfocytów i histiocytów (Ryc. 33, 34).

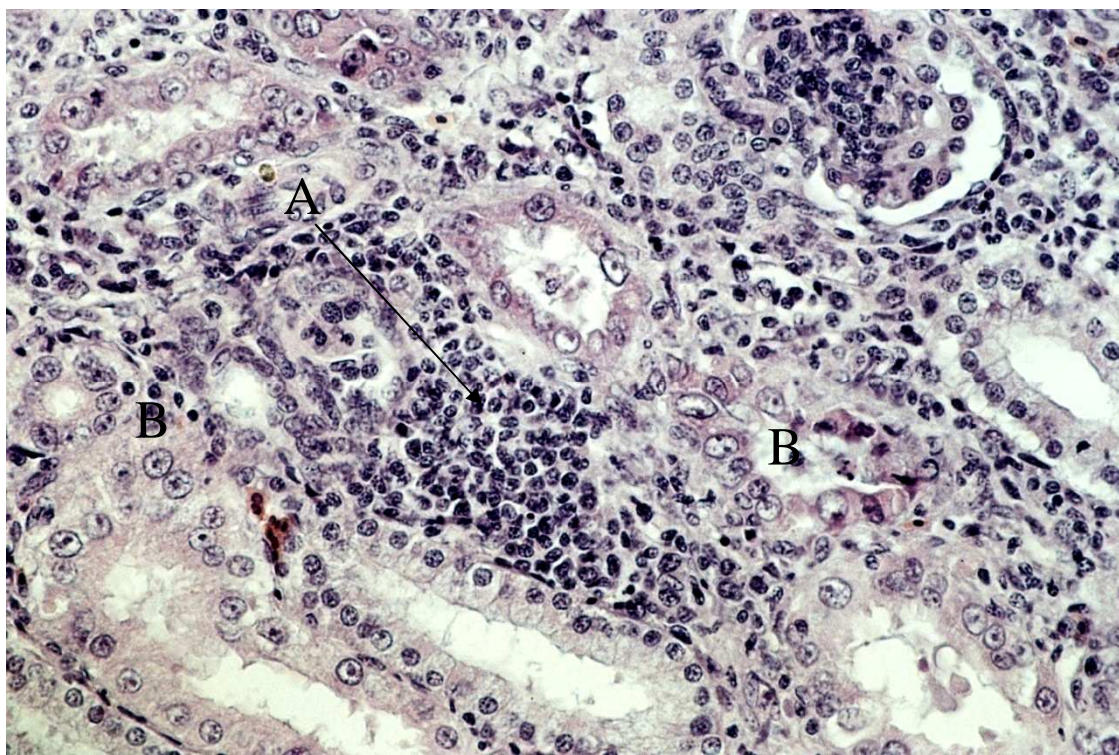
W grupie kurcząt doświadczalnych K-2 zmiany histopatologiczne nerek są bardziej nasilone niż w grupie K-1. Nabłonki kanalików nerkowych są obrzmiałe powodując znaczne zwężenie światła kanalika, a ziarnista cytoplazma ogranicza widoczność jądra komórkowego. Pojedyncze komórki nabłonkowe ulegają rozpadowi. Naczynia krwionośne są rozszerzone wypełnione erytrocytami (Ryc. 33, 34). Ponadto w tkance łącznej śródmiąższowej obecne są obfite nacieki zapalne (Ryc. 34).



Ryc. 32. Nerka kurcząt grupy Kontrolnej H- E Pow. x 200.



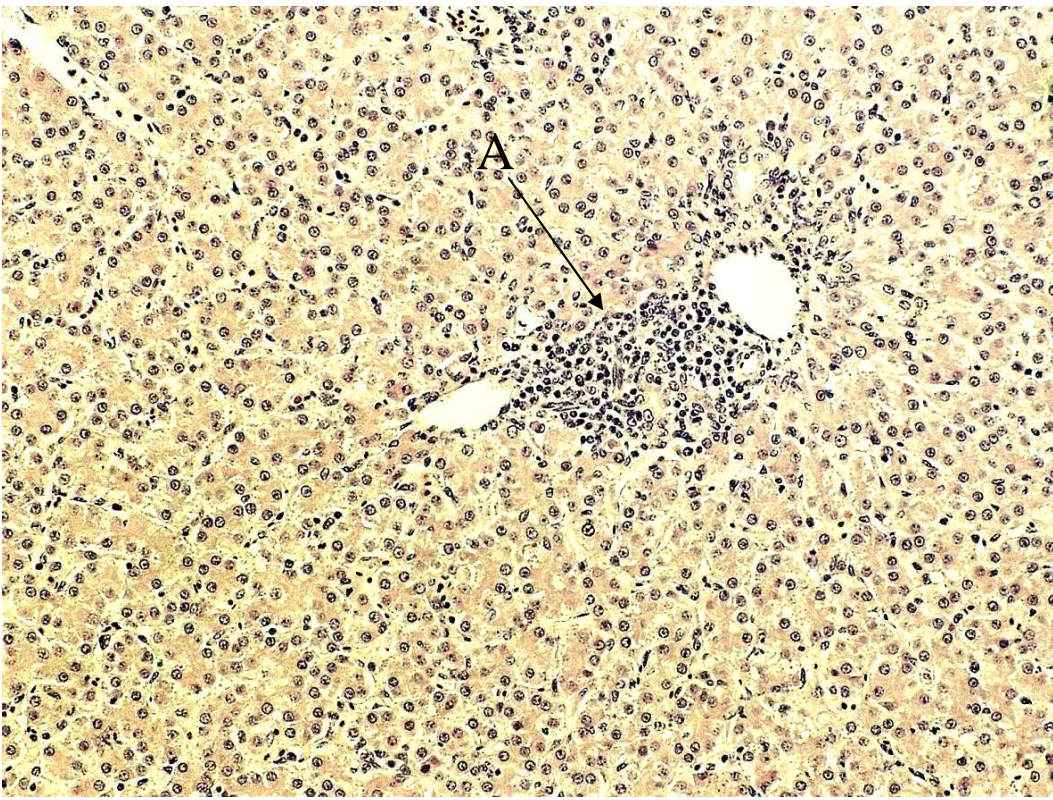
Ryc. 33. Nerka kurcząt grupy K-1. Widoczne obrzmienie komórek nabłonka kanalików nerkowych (A) oraz obecność złuszczonych nabłonków w świetle kanalików (B). H-E. Pow. x 400.



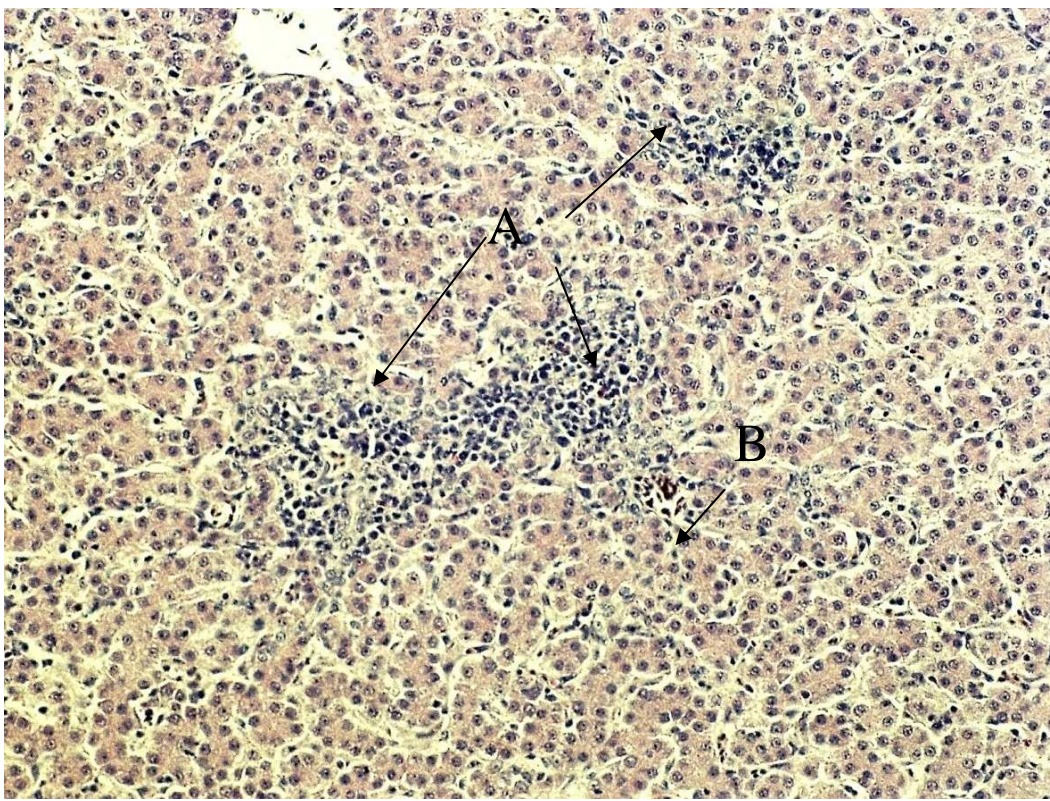
Ryc. 34. Nerka kurcząt grupy K-2. Widoczne obrzmienie i rozpad komórek nabłonka (B) oraz masywne nacieki zapalne w tkance śródmiąższowej (A). H-E. Pow. x 400.



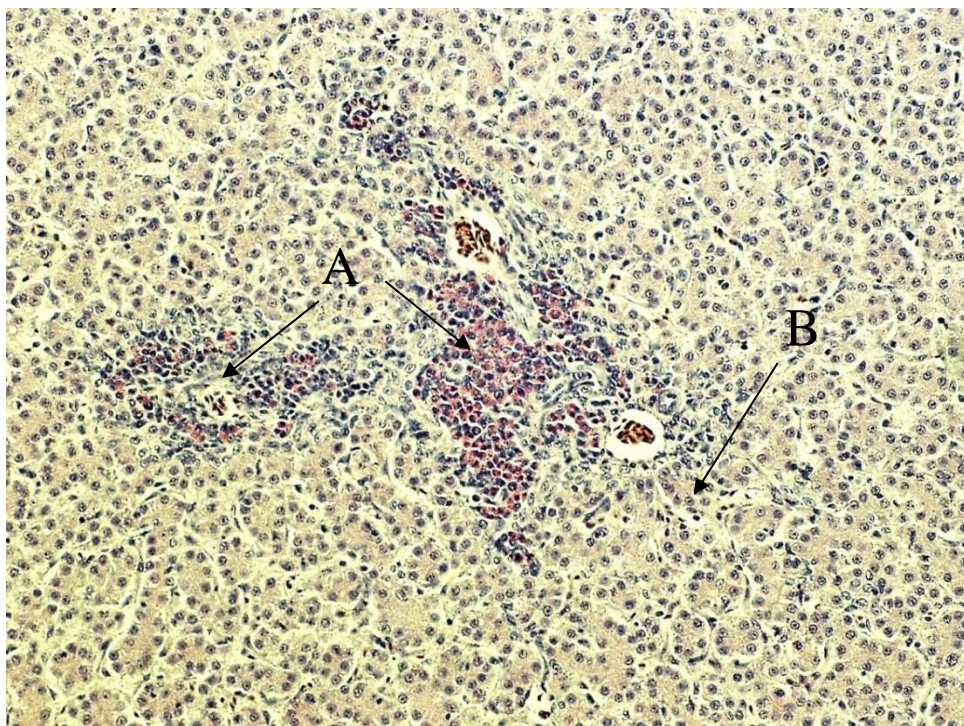
Wątroba kurcząt kontrolnych nie wykazywała zmian histopatologicznych. Hepatocyty są kształtu i wielkości prawidłowej z dobrze widocznymi jądrami. Wokół większych naczyń obecne są niewielkie nacieki limfocytarne. Struktura układu naczyniowego wątroby zachowana. W świetle naczyń obecne liczne erytrocyty (Ryc. 35) . U kurcząt doświadczalnych zarówno grupy K-1 jak i K-2 komórki wątrobowe były obrzękłe, a ich cytoplazma zawierała liczne ziarnistości ograniczające widoczność jądra. Miejscami widoczne były niewielkie nacieki komórek zapalnych złożone głównie z limfocytów, histiocytów i heterofilów (Ryc. 36, 37).



Ryc. 35. Wątroba kurcząt kontrolnych. Prawidłowa struktura histologiczna. Widoczne niewielkie nacieki okołonaczyniowe (A). H&E. Pow. x 100.



Ryc. 36. Wątroba kurcząt grupy K-1.  
Przyćmienie mięszkowe hepatocytów (B) oraz drobne nacieki zapalne (A). H-E.  
Pow. x 100



Ryc. 37. Wątroba kurcząt grupy K-2.  
Przyćmienie mięszkowe hepatocytów (B) oraz infiltracja komórek  
zapalnych (A). H-E. Pow x 100.

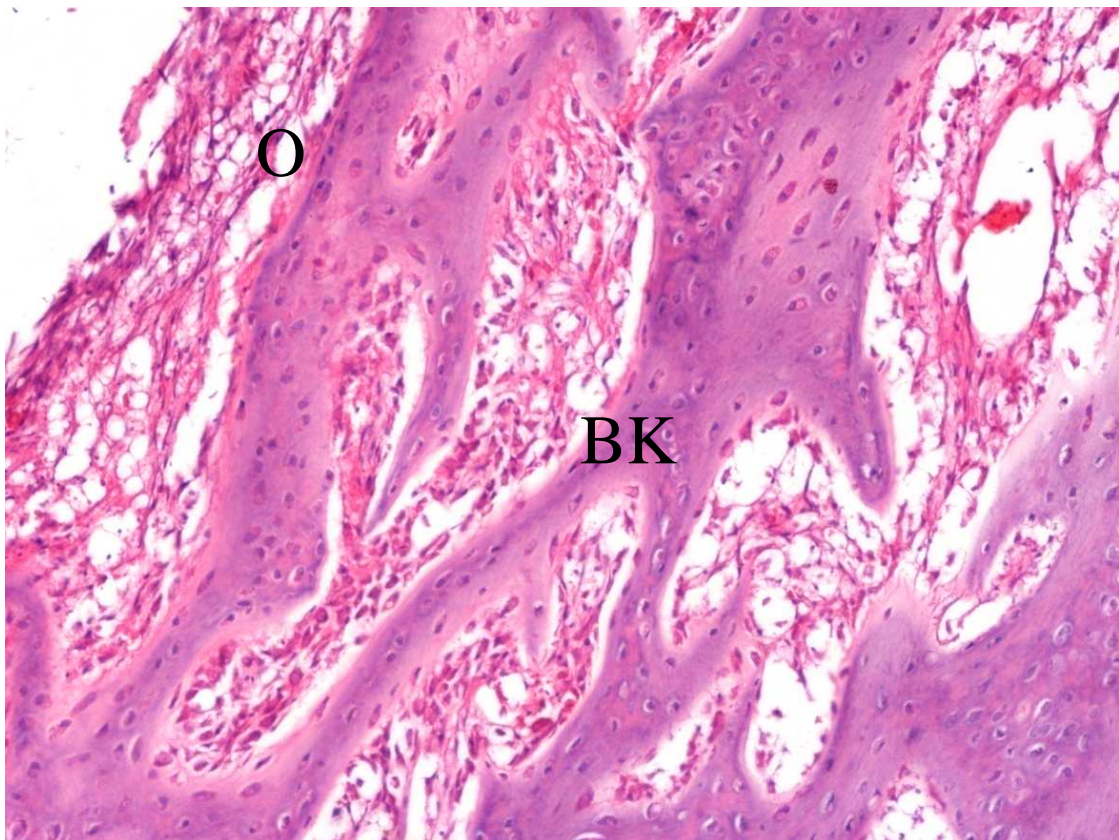
Badania histopatologiczne kości piszczelowej wykazały, że u 25 dniowego zdrowego kurczęcia od strony okostnej zaznacza się wysoka aktywność komórek osteogennych (Ryc. 38). Okostna w tym miejscu jest zgrubiała, zbudowana z kilku warstw wyraźnie odstających od kości. Pomiedzy włóknami kolagenowymi okostnej obserwuje się liczne osteoblasty formujące nowe beleczki tkanki kostnej. Pomiedzy beleczkami widoczne są naczynia krwionośne wypełnione krwią.

W części centralnej ściany kości na powierzchni zatok resorpcyjnych widoczne są liczne osteoblasty „zabudowujące” wcześniej zresorbowane fragmenty (Ryc. 42). Za proliferującymi osteoblastami postępują angioblasty, tworząc pęczek naczyniowy, z którego rozwiną się naczynia krwionośne osteonu. Nowe blaszki kostne wyraźnie odgraniczają nowopowstałą kość od starej. Osteoblasty w tych miejscach ułożone są w taki sposób, że przypominają nabłonek płaski lub sześcienny. U ptaków, niezwykle rzadko komórki te układają się w kilka rzędów, co teoretycznie umożliwia powstawanie kilku blaszek w jednakowym czasie jak ma to miejsce np. u psów czy owiec. Konsekwencją tak postępujących procesów jest w 35 dniu (K0/35) dobrze rozwinięta tkanka kostna nabudowana przez apozycję od strony okostnej. Powstałe tutaj beleczki kostne ulegają zarastaniu. Procesom kościotwórczym towarzyszy silna angiogeneza, co prowadzi do powstania nowych generacji osteonów. Ich przebieg w odróżnieniu od kości pierwotnej jest zazwyczaj okrężny w stosunku do osi długiej (Ryc. 40). Od strony jamy szpikowej w wyniku działania komórek linii osteoklastycznej dochodzi do powolnego poszerzania jamy szpikowej (Ryc. 43, 44).

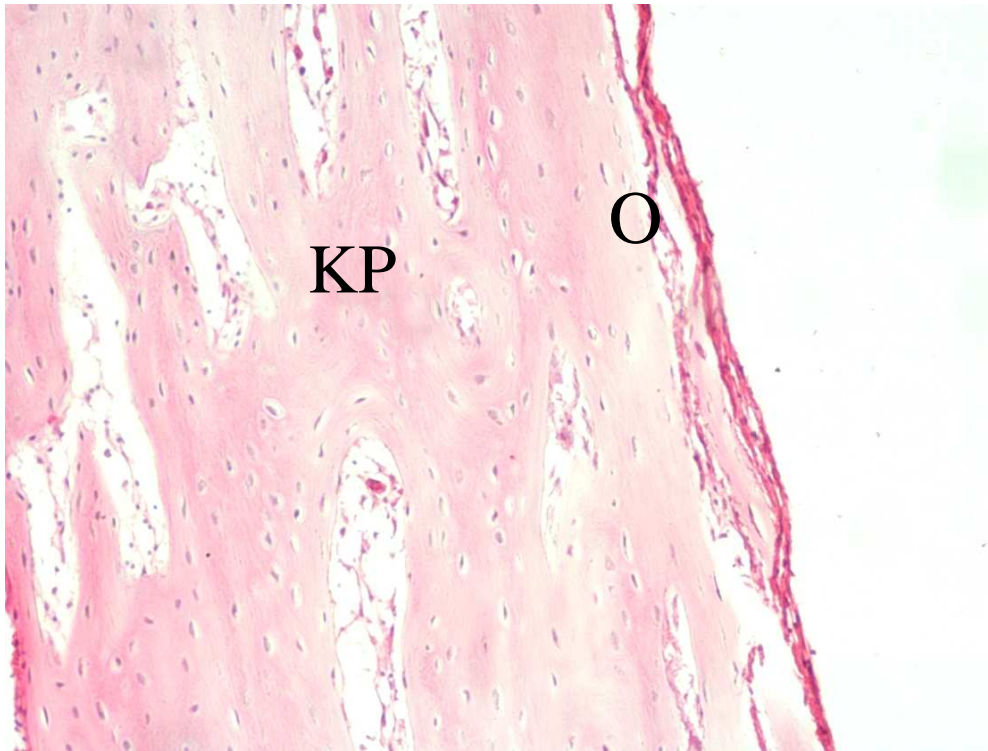
Liczba miejsc w których zachodzi resorpcja kości jest mniejsza niż w 25 dniu. W części centralnej ściany kości piszczelowej, na powierzchni beleczek kostnych obecne są komórki powierzchni kości co świadczy o zaprzestaniu w tym miejscu procesów kościotworzenia. W grupie eksperymentalnej (K-1), w 25 dniu życia po 10 dniach podawania ochratoksyny A zaznacza się drastyczny spadek liczby komórek kościotwórczych zarówno od strony okostnej jak i wewnątrz kości (Ryc. 39). Resorpcja od strony jamy szpikowej utrzymuje się na podobnym poziomie jak u ptaków zdrowych. Konsekwencją tych zmian jest zahamowanie kościotworzenia od strony okostnej. Po 20 dniach podawania ochratoksyny (grupa K2) dochodzi do istotnych zaburzeń w strukturze kości. W wyniku utrzymującej się stałej osteoresorpcji i słabemu kościotworzeniu nie obserwuje się odokostnowego odtworzenia kości. Tkanka kostna zachowuje swój pierwotny układ. Nie tworzą się osteony o przebiegu okrężnym. Od strony nadal silnie

splaszczonej okostnej obserwuje się osteoblasty wypełniające puste przestrzenie powstałe w wyniku pierwotnego formowania kości (Ryc. 41).

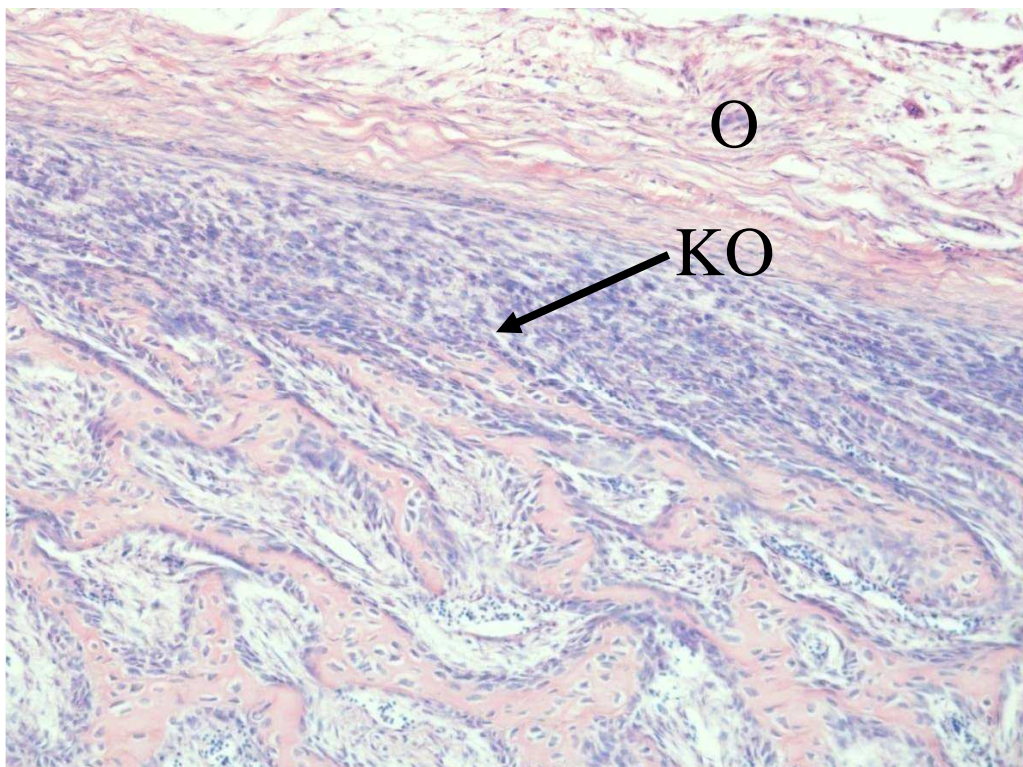
Natomiast szpik kostny ptaków grup doświadczalnych wykazuje tylko nieznaczne zaburzenia. Liczba koloni krwiotwórczych jest mniejsza niż w kontroli zarówno w 10 jak i 20 dniu eksperymentu. W obrazie histologicznym przedstawia się to jako „przerzedzenia” w szpiku kostnym, dzięki którym widać komórki zrębu oraz komórki tłuszczowe (Ryc. 45).



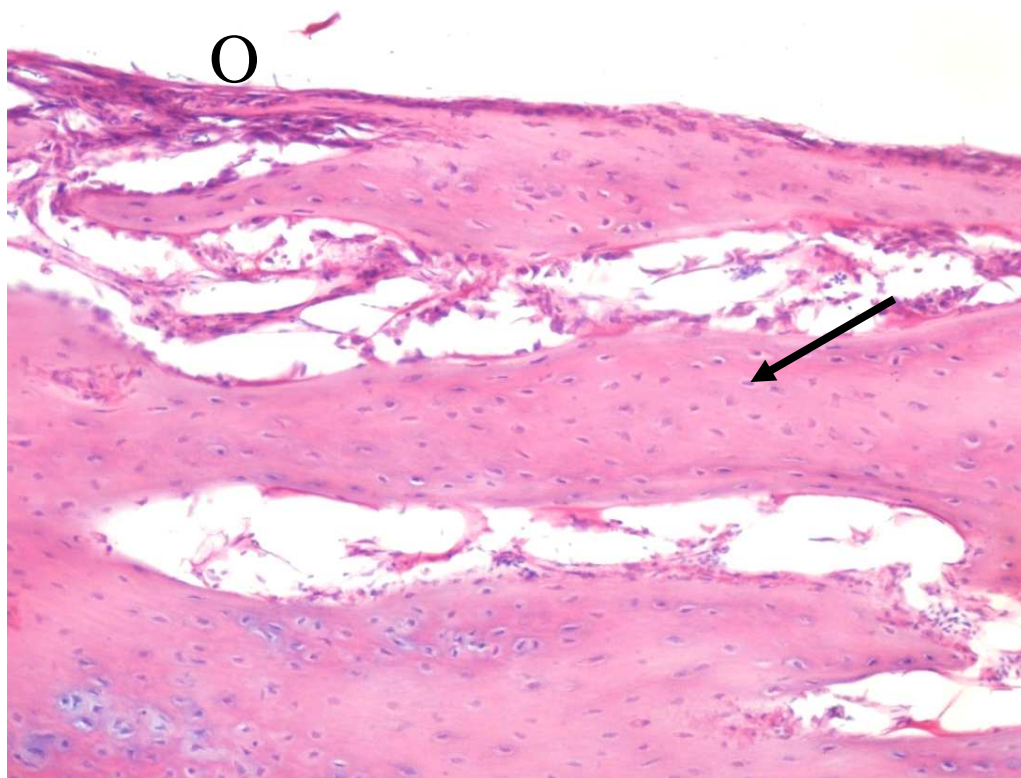
Ryc. 38. Kość ptaka grupy kontrolnej (K-0/25) od strony okostnej (O). Widoczne są przykryte okostną nowopowstałe beleczki kostne (BK), na powierzchni których licznie występują osteoblasty. H-E Pow. 200x



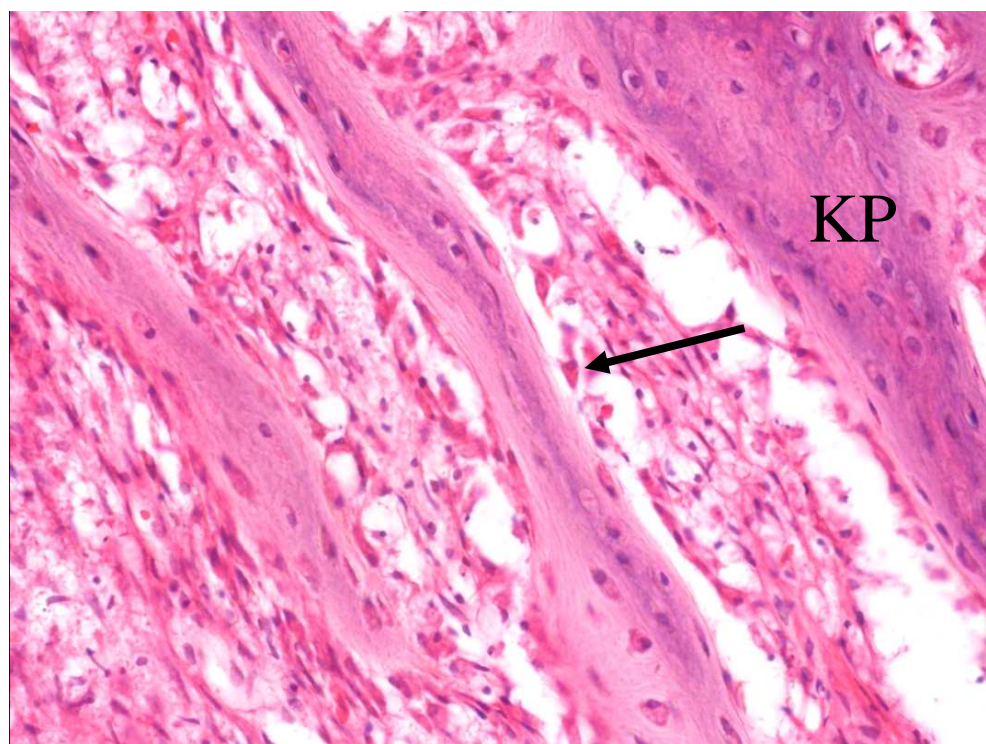
Ryc. 39. Kość ptaków doświadczalnych grupy K-1. Widoczna jest, silnie spłaszczona okostna (O) i kość pierwotna (KP). Brak proliferacji osteoblastów. H-E pow x 200



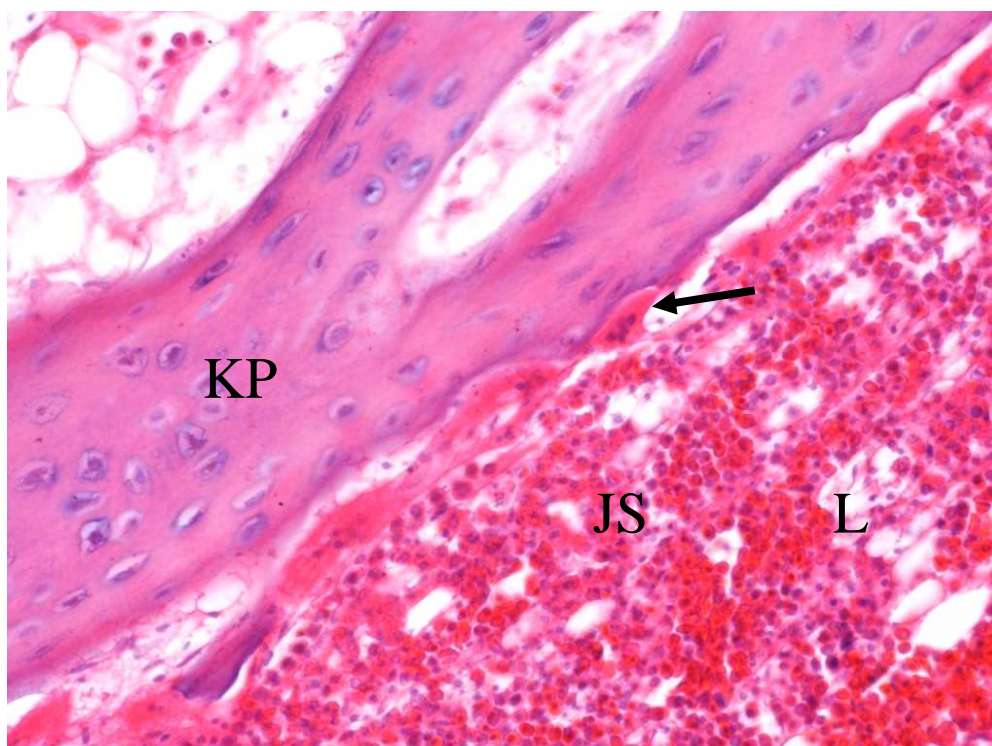
Ryc. 40. Przekrój przez kość ptaków grupy kontrolnej (K-0/35) od strony okostnej. Widoczna okostna (O) zbudowana z dwóch warstw oraz kość powstała w wyniku odokostnowego kościotworzenia (KO). Pomiędzy wytworzonymi bełczkami kostnymi liczne osteoblasty (strzałka) H-E pow x 200



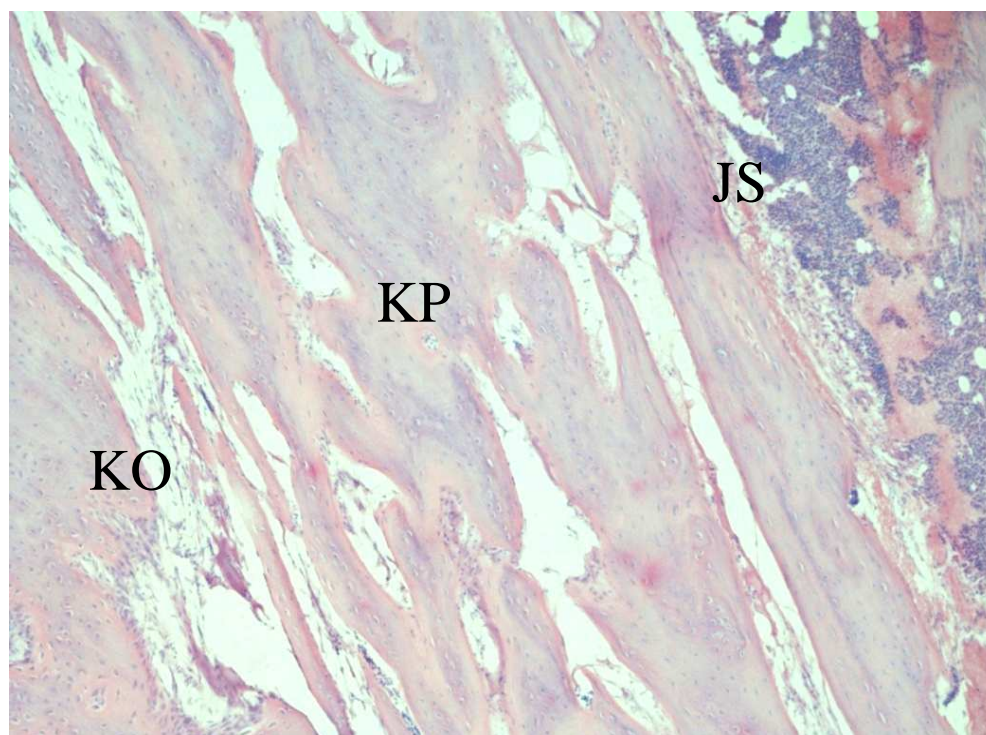
Ryc. 41. Kość ptaków grupy doświadczalnej K-2. Widoczna silnie spłaszczona okostna zbudowana z tkanki łącznej (O). Od niej, w głąb kości wnikają osteoblasty które zabudowują przestrzenie pomiędzy beleczkami kości pierwotnej (strzałka). H-E pow. x 200



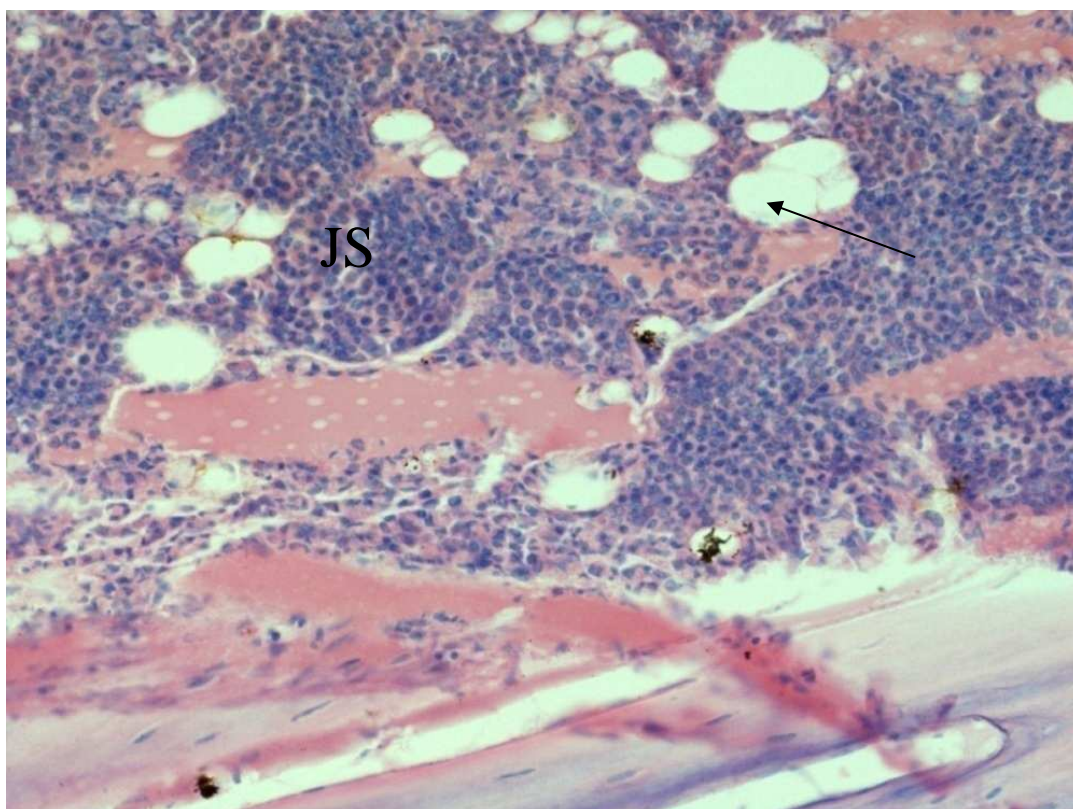
Ryc. 42. Kość ptaka grupy kontrolnej (K-0/35). Osteoblasty (strzałka) zabudowują przestrzenie pomiędzy beleczkami kości pierwotnej (KP). H-E pow. x 400



Ryc. 43. Kość ptaka grupy kontrolnej (K-0/35) od strony jamy szpikowej (JS). Osteoklasty (strzałka) resorbują kość pierwotną (KP). Pomiędzy koloniami krwiotwórczymi widoczne są nieliczne komórki tłuszczowe (L) H-E pow. x 400



Ryc. 44. Przekrój przez kość ptaków kontrolnych (K-0/35). Widoczna jama szpikowa (JS), kość pierwotna (KP) oraz kość powstała w wyniku tworzenia odokostnowego (KO). H-E pow. 100x



Ryc. 45 Kość ptaków grupy (K-2) od strony jamy szpikowej (JS). Pomędzy koloniami krwiotwórczymi widoczne pojedyncze komórki tłuszczowe (strzałka) H-E pow. 400x

### Mineralizacja tkanki kostnej

Skład pierwiastków w kościach badano od strony okostnej i śródkostnej. Wyznaczono na tej podstawie współczynnik wapnia do fosforu (Ca/P) charakteryzujący morficzność kryształów. Wyznaczono również stosunek węgla do sumy wapnia i fosforu (C/Ca+P) określający stopień wysycenia macierzy kostnej przez kryształy hydroksyapatytu (tab. 14).

Tab. 14. Współczynniki charakteryzujące stopień mineralizacji tkanki kostnej.

	Ca/P	C/(Ca+P)
K0/25	2,69	17,294
K1	9,08	17,962
K0/35	2,14	20,44
K2	3,85	27,56

Wartość referencyjna dla Ca/P= 1,67



W technice analizy składu pierwiastkowego metodą mikroanalizy rentgenowskiej nie ma możliwości wykrycia wodoru oraz litu. Obok głównych pierwiastków takich jak węgiel, tlen, wapń i fosfor, w kościach stwierdzono różną zawartość sodu, siarki, magnezu, żelaza oraz pierwiastków śladowych jak glin i krzem. Siarka wchodzi w skład między innymi tzw. białek macierzy bogatych w cysteinę, których obecność stwierdza się na początku procesu mineralizacji. Na podobnym poziomie siarkę zaobserwowano w grupie K0-25 i K2. Może to oznaczać, że stopień zaawansowania procesów mineralizacyjnych w grupie K2 w 35 dniu jest podobny jak u ptaków w grupie K0-25 tj. w 25 dniu życia. Żelazo jest składnikiem hemu i jego obecność w kościach można tłumaczyć rozkładem erytrocytów, który następuje w wyniku obróbki chemicznej kości. Glin czy krzem stanowią zanieczyszczenie, które może dostawać się do kości w wyniku mechanicznej obróbki materiału, ponieważ w stosowanej technice uzyskanie idealnie czystego materiału nie jest niemożliwe.

## **DYSKUSJA**

Przeprowadzone badania wykazały, że ochratoksyna A w dawce 6 mg/kg podawana przez 10 lub 20 dni powoduje znaczne zmniejszenie przyrostów masy ciała kurcząt brojlerów zależne od stężenia ochratoksyny w paszy oraz czasu ekspozycji [31, 42, 45, 46, 54, 73, 81, 88]. Również Huff i współpracownicy, Prior M.G wykazali w swoich badaniach zmniejszenie wzrostu brojlerów karmionych paszą zawierającą ochratoksynę w ilości 1 mg/kg [52, 87]. Zaburzenia te były obserwowane także przy dawce 0,567 mg/kg [123], 0,5-1, 2, 4, 8 mg/kg [73]. Goliński wykazał, że podawanie kurczętom paszy zawierającej ochratoksynę A w dawce 1,5 mg/kg w ciągu czterech tygodni powoduje obniżenie masy ciała samców o 39%, samic o 30%, a po ośmiu tygodniach masa ciała była niższa odpowiednio o 28% i 21% [45]. Przy dawce 2 ppm zużycie paszy było mniejsze o 12% w porównaniu do kur kontrolnych [60].

Wydaje się, że w pierwszym rzędzie gorsze przyrosty spowodowane były mniejszym spożyciem paszy. Ptaki doświadczalne zjadały bowiem o 19% mniej paszy niż kurczęta kontrolne, co było przypuszczalnie spowodowane zmniejszeniem jej smakowitości. Mikotoksyny zmieniają bowiem niekorzystnie cechy organoleptyczne pasz: zapach, barwę i smak. Jednak niezależnie od mniejszego spożycia paszy ochratoksyna A powoduje zaburzenia metabolizmu białek i węglowodanów [131]. Wpływa bowiem hamująco na czynność karboksypeptydazy A odgrywającej istotną rolę w metabolizmie białek [106]. Blokuje także wykorzystanie glikogenu konkurując przypuszczalnie z 3',5'-cyklicznym AMP o b-kinazę fosforylazową [128]. Innym ważnym czynnikiem odpowiedzialnym za gorsze przyrosty masy ciała ptaków są zaburzenia w funkcjonowaniu przewodu pokarmowego. Badania morfometryczne błony śluzowej wykazały skrócenie kosmków jelitowych. Po 10 dniach podawania ochratoksyny kosmki jelita czczego uległy skróceniu tylko o 8%, a jelita biodrowego o 6%. Jednak po 20 dniach skrócenie kosmków wynosiło już odpowiednio 16% i 19%. To skrócenie długości kosmków jelitowych powoduje znaczne zmniejszenie całkowitej powierzchni chłonnej jelita i ogranicza wchłanianie substancji odżywczych, przekładając się bezpośrednio na gorsze przyrosty masy ciała.

Interesujący wydaje się fakt, że skrócenie kosmków jelitowych nie znalazło swojego odzwierciedlenia w następującym z reguły po uszkodzeniu kosmków kompensacyjnym przeroście krypt. Przeciwnie, krypty uległy po 10 dniach skróceniu w jelicie czczym i jelicie biodrowym odpowiednio o 6% i 10%, a po 20 dniach o 33% i 41%. Może to

oznaczać, iż obserwowane skrócenie kosmków wynika nie tylko, a może nawet nie tyle z bezpośredniego uszkodzenia przez ochratoksynę nabłonka jelitowego, lecz przede wszystkim z osłabionej proliferacji komórek krypt jelitowych stanowiących strefę regeneracyjną błony śluzowej, odpowiedzialnej za nieustanne zasilanie kosmków nowymi komórkami w miejsce tych, które po 2-3 dniach pełnienia swoich fizjologicznych funkcji zostają złuszczone na szczycie kosmka. Zatem zarówno wielkość jak i kształt kosmków są w istocie funkcją, stanem dynamicznej równowagi pomiędzy szybkością zużywania się i złuszczenia enterocytów kosmków oraz proliferacją komórek krypt. Dodatkowym czynnikiem upośledzającym rozwój ptaka była pojawiająca się już od trzeciego dnia doświadczenia i stopniowo nasilająca się w czasie biegunka. Nabłonek jelitowy składa się z pryzmatycznych komórek zespolonych ze sobą ścisłymi połączeniami międzykomórkowymi [83] i pełni on dwie odmienne funkcje. Z jednej strony aktywnie uczestniczy w absorpcji składników ze światła przewodu pokarmowego, z drugiej zaś stanowi podstawowy element bariery między światłem jelita a krwiobiegiem [83]. Bariera ta zabezpiecza przed wnikaniem toksyn, bakterii, wirusów i pasożytów ze światła jelita do tkanek i łożyska naczyniowego [32, 75-98]. Obie wymienione funkcje kontrolowane są przez mikrodomeny wchodzące w skład błony plazmatycznej komórek nabłonka jelitowego. Każda mikrodomena składa się z wielofunkcyjnych molekuł glikolipidów oraz białek o masie cząsteczkowej 30 - 180 kilodaltonów. Ochratoksyna A będąc inhibitorem syntezy białek uszkadza selektywnie składniki białkowe błony plazmatycznej komórek nabłonka jelitowego, w szczególności białka o masie molekularnej: 30, 40, 52, 56, 60, 80, 114, 140 oraz 180 kilodaltonów. W konsekwencji zaburzone zostaje zależne od jonów Na wchłanianie glukozy, której absorpcja spada o 50%. Ponieważ wchłanianie glukozy wiąże się ze zwrotnym wchłanianiem wody (u człowieka około 4 litry dziennie), niewchłonięta woda pozostaje w świetle jelit dając objawy biegunki. Obserwujemy także zaburzenie przepuszczalności ścisłych połączeń międzykomórkowych. Obniżenie transepitelialnej oporności jelita powoduje wzmożone przenikanie płynów do światła jelita i biegunkę. Powoduje ono jednak także przenikanie różnych ksenobiotyków przez rozszczelnioną barierę jelitową do krwiobiegu. Uszkodzenie przez OA bariery jelitowej stwarza ponadto dogodne warunki dla kolonizacji jelita przez mniej lub bardziej patogenne bakterie, np. *Salmonella* sp. [72].

Nefrotoksyczność ochratoksyny A została stwierdzona przez wielu autorów [3, 21, 51, 57, 90, 92, 97, 108, 121, 132] i jest w zasadzie głównym kierunkiem jej patogenicznego działania. Badania wykonane w Danii, Polsce na Węgrzech oraz w Skandynawii

wykazały, że ochratoksyna A jest głównym czynnikiem etiologicznym choroby zwanej mikotoksykozową nefropatią świń. U świń karmionych paszą skażoną ochratoksyną w ilości 0,2 mg/kg w ciągu kilku miesięcy rozwija się nefropatia, a dawka 1-1,4 mg/kg powoduje już po dwóch tygodniach bladość i zmiany martwicowe nerek. W badaniach własnych nerki kurcząt doświadczalnych wykazywały różnego stopnia zmiany zwyrodnieniowe nabłonka kanalików nerkowych i nacieki zapalne tkanki śródmiąższowej. W zaawansowanym stadium choroby dochodziło do rozpadu i złuszczenia nabłonka do światła kanalików. Konsekwencją niewydolności nerek był obserwowany wzrost poziomu kwasu moczowego i kreatyniny w moczu. Wyniki te są zgodne z wynikami uzyskanymi przez innych autorów, którzy stwierdzili wzrost poziomu kwasu moczowego w surowicy przy skarmianiu kurcząt paszą zawierającą ochratoksynę A w ilości 2 mg/kg [106, 108]. Natomiast Patil i współpracownicy [86] stwierdzili wzrost w surowicy kwasu moczowego u kurcząt skarmianych paszą skażoną ochratoksyną A w ilości 0,75 mg/kg w ciągu 45 dni.

Wszystkie mechanizmy związane z transportem i biotransformacją OA zlokalizowane są w proksymalnej części kanalików nerkowych. We krwi ochratoksyna występuje w postaci związanej z albuminami. Jednak Stojković stwierdził obecność we krwi frakcji białkowej o niskiej masie cząsteczkowej (20000 Da), która wiąże ochratoksynę A bardziej specyficzniej niż albuminy. Wiązanie ochratoksyny do tych drobnocząsteczkowych białek sprawia, że kompleksy takie mogą łatwiej przechodzić przez błonę kłębuszka nerkowego [80]. W sumie jednak tylko w 25% jest ona filtrowana w kłębuszkach i przechodzi do moczu pierwotnego. W 75% jest aktywnie wydzielana za pośrednictwem transportera MPR-2 [33, 133] nabłonka środkowej części S2 i końcowej części S3 kanalików nerkowych [73, 106]. Ze światła kanalika może być ona jednak reabsorbowana przez kotransporter H<sup>+</sup> dwupeptydowy i kumulowana w komórkach nabłonka kanalików. Kumulacja OTA w komórkach powoduje ich uszkodzenie z zaburzeniem systemu transportu anionów organicznych MPR-2 odpowiedzialnego za eliminację ochratoksyny oraz innych substancji drogą moczową. Ostre zatrucie ochratoksyną A prowadząc poprzez blokadę transportu anionów przez błony komórkowe do zaburzenia funkcji post proksymalnych nefronów powoduje zaburzenie równowagi i filtracji elektrolitów. W konsekwencji prowadzi to do zaburzenia równowagi kwasowo-zasadowej w komórkach [80].

Dysfunkcja kanalików nerkowych powoduje także zaburzenia zwrotnego wchłaniania i znaczne straty albumin wydalanych z moczem. W konsekwencji w badaniach własnych

obserwowano (albuminurię) przy jednoczesnym spadku poziomu albumin (hipoalbuminemia) w surowicy kurcząt doświadczalnych.

Albuminy stanowią 60% białka całkowitego surowicy krwi i produkowane są głównie w wątrobie. W badaniach własnych wykazano znaczne uszkodzenie hepatocytów związane z dysfunkcją mitochondriów, stanowiących główne źródło energii niezbędnej do syntezy cholesterolu, budującego struktury błon komórkowych. W konsekwencji doszło do zmniejszenia produkcji albumin w wątrobie, co dodatkowo obniża ich poziom w surowicy kurcząt doświadczalnych. Jednak badania Nedeljkovic i wsp. wykazały, że podawanie kurczętom niskiej dawki ochratoksyny (0,5 mg/kg paszy) przez okres 7-21 dni spowodowało nie spadek, ale wzrost poziomu albumin w surowicy [81]. Wydaje się, że ta rozbieżność wyników związana jest ze znacznym zróżnicowaniem wysokości dawki, która w moim doświadczeniu była 12 razy większa. Niewielka dawka ochratoksyny w doświadczeniu Nedeljkovic spowodowała przypuszczalnie reakcję adaptacyjną z pobudzeniem hepatocytów i wzmożoną produkcją albumin, które wiązały znaczną część OTA we krwi, ograniczając jej uszkadzające działanie na narządy wewnętrzne. Pobudzenie wątroby było w tym przypadku większe od uszkodzenia nerek i ucieczki albumin z moczem.

Zmiany patologiczne wywołane ochratoksyną A w komórkach kanalików nerkowych są rezultatem jej wielokierunkowego działania, a w szczególności hamowaniem tRNA-syntetazy i syntezy białek, hamowaniem aktywności mitochondriów i wzrostem peroksydacji związków lipidowych. Ochratoksyna powoduje bowiem powstanie rodników nadtlenkowych uszkadzających struktury błonowe. Wiele doniesień wskazuje, że ochratoksyna A konkurencyjnie hamuje biosyntezę białek wewnętrznej błony mitochondrialnej, co prowadzi do zaburzenia produkcji energii (zmniejszenie produkcji ATP) [103]. Zaburzenie przez ochratoksynę A syntezy białek na poziomie błony organeli komórkowych prowadzi do utraty ich integralności ze wzrostem we frakcji komórkowej poziomu enzymów lizosomalnych i peroksyzomalnych, co w konsekwencji prowadzi do zmian zwyrodnieniowych i martwicy nabłonka kanalików nerkowych [105]. Obserwowane w badaniach własnych zwiększenie w surowicy poziomu fosfatazy alkalicznej prawdopodobnie jest wynikiem uszkodzenia funkcji nabłonków kanalików nerkowych. Enzym ten zlokalizowany jest bowiem w znacznej ilości w rąbku szczoteczkowym tych komórek, jakkolwiek jest on także obecny w komórkach kości, nabłonków kanalików żółciowych i nabłonku błony śluzowej jelit [74]. Badania na szczurach wykazały nawet przy niskich dawkach OTA uszkodzenie rąbka

szczoteczkowego i obniżenie poziomu fosfatazy alkalicznej, leucyno aminopeptydazy oraz gama-glutamylu-transefazy w nabłonku kanalików nerkowych, z ich jednoczesnym wzrostem w surowicy krwi [10, 104].

Reasumując można powiedzieć, że nefrotoksyczne działanie ochratoksyny A jest spowodowane nie tylko zaburzeniem syntezy białek i peroksydacją lipidów błonowych, lecz także przez hamowanie mechanizmów odpowiedzialnych na transport anionów organicznych w obrębie podstawno-bocznej błony komórek kanalików nerkowych i rąbka szczoteczkowego. Dodatkowo hamowana jest w mitochondriach produkcja energii niezbędnej do funkcjonowania transporterów błonowych. W konsekwencji ochratoksyna z moczu pierwotnego jest reabsorbowana i kumuluje się w proksymalnych kanalikach nasilając działanie nefrotoksyczne.

Układ immunologiczny jest podstawowym elementem utrzymania integralności organizmu eliminując wirusy, bakterie, grzyby i pasożyty. Spełnia on te funkcje w interakcji z układem nerwowym oraz układem gruczołów wydzielania wewnętrznego za pośrednictwem neurotransmiterów, hormonów i cytokin. Jest on jednak wrażliwy na działanie wielu czynników środowiskowych jak ksenobiotyki, endotoksyny, enterotoksyny, mikotoksyny czy promieniowanie UV. Morfologicznym wyrazem immunosupresji jest zmniejszenie wielkości narządów układu immunologicznego: śledziony, grasicy, węzłów chłonnych oraz torby Fabrycjusza, a także zmiany w liczbie i funkcji komórek układu immunologicznego.

Przeprowadzone przeze mnie badania wykazały znacznego stopnia uszkodzenie przez ochratoksynę A układu immunologicznego ptaków. Było to widoczne w torbie Fabrycjusza, która jest szczególnie wrażliwa na działanie różnych czynników patogennych [57, 28, 29].

Badania mikroskopowe potwierdziły obecność zmian zwyrodnieniowych, martwicy i apoptozy z deplecją komórek limfoidalnych w grudkach torby Fabrycjusza, wskazujących na silne immunotoksyczne działanie ochratoksyny A. Zmiany zwyrodnieniowe oraz deplecja komórek limfoidalnych w torbie Fabrycjusza i śledzionie stwierdzono także u indyków po skarmianiu paszy zawierającej 2-4 mg/kg ochratoksyny A [29]. Chang i współpracownicy stwierdzili wzrost liczby heterofilów u brojlerów zatrutych ochratoksyną A związany z zaburzeniem zdolności fagocytarnej układu immunologicznego tych ptaków [21].

Mikotoksyny wykazują duże powinowactwo do komórek szybko proliferujących, oraz do tkanek o intensywnej syntezie białek jak jelita, wątroba oraz układ immunologiczny [47,

102]. Stwierdzono u ptaków karmionych przez 21 dni paszą zawierającą ochratoksynę A w ilości 2-4 mg/kg, zmniejszenie masy narządów limfatycznych: grasicy, torby Fabrycjusza i śledziony, spadek białka całkowitego surowicy i liczby limfocytów [28, 57]. Skarmianie kurcząt brojlerów paszą skażoną ochratoksyną A w ilości zarówno 2 mg/kg jak i 4 mg/kg przez dwadzieścia dni powoduje zmniejszenie stężenia immunoglobulin klasy IgG, IgA, IgM w surowicy oraz w tkankach limfatycznych [22, 28, 57, 93]. Obserwowano także zmniejszenie aktywności komórek NK [14, 73, 106].

U świń karmionych paszą skażoną ochratoksyną A w ilości 0,06 mg/kg paszy nastąpiło osłabienie odpowiedzi immunologicznej o 10%. Natomiast dawka 2,5 mg/kg spowodowała zmniejszenie aktywności fagocytarnej makrofagów i produkcji interleukiny-2. Zwierzęta te wykazywały ponadto wzmożoną wrażliwość na zakażenie *Salmonella choleraesuis*, *Serpulina hyodysenteriae* oraz *Campylobacter coli* [108]. Inne badania wykazały, że u szczurów ochratoksynę A podaną dootrzewnowo w ilości 20-80 mg/kg co drugi dzień w ciągu ośmiu dni nastąpiło zmniejszenie proliferacji komórek w szpiku kostnym, zmniejszenie masy grasicy o około 33%, oraz zmniejszenie aktywności fagocytarnej. Stężenie 10-1000 ng/ml powoduje hamowanie aktywności metabolicznej, proliferacji komórkowej, integralności błon komórkowych i zdolności fagocytarnej [79]. Mechanizm immunosupresji nie jest dokładnie wyjaśniony. Prawdopodobnie ochratoksyna A poprzez hamowanie syntezy białek w limfocytach zaburza prawidłową proliferację komórek układu immunologicznego, a także osłabia ich aktywność i proces różnicowania [102]. Również w śledzionie obserwowano zanik narządu i rozrzedzenie tkanki limfatycznej. Działanie immunosupresyjne wykazuje także powstający w wątrobie metabolit OH-OTA [131].

Reasumując można powiedzieć, że immunosupresja wywołana mikotoksynami charakteryzuje się:

- Zmniejszeniem aktywności limfocytów T i B.
- Hamowaniem produkcji przeciwciał.
- Hamowaniem funkcji efektorowych makrofagów i neutrofilów.
- Hamowaniem aktywności komórek bójczych.

Wywołana przez ochratoksynę immunosupresja zmniejsza odporności organizmu na różne zakażenia wirusowe i bakteryjne i/lub inwazje pasożytnicze, a także może aktywować przewlekłe zakażenia. Może ona także wpływać na mniejszą skuteczność leków i szczepionek [85]. Wiele doniesień wskazuje, że mikotoksyny, a w szczególności ochratoksyna A wykazuje działanie immunotoksyczne prowadząc do immunosupresji, [4,

5, 21, 22, 28, 29, 31, 42, 57, 85, 93, 102, 119] która sprzyja różnym zakażeniom bakteryjnym [93], wirusowym oraz procesom nowotworowym [68, 69, 131]. Stwierdzono, że u ptaków, szczególnie indyków otrzymujących paszę skażoną ochratoksyną, często dochodzi do zapalenia worków powietrznych (air sacculitis) [29, 62, 73].

Informacje o wpływie mykotoksyn na właściwości mechaniczne kości ptaków są nieliczne. Badania przeprowadzone w latach 80 przez Huffa i współpracowników [54] dotyczące wpływu aflatoksyny i ochratoksyny wskazywały, że aflatoksyna w istotny sposób wpływa na biologię kości kurcząt. Określony przez badaczy stopień zdolności do przenoszenia fizjologicznych obciążeń osiągnął w tej grupie wartości ośmiokrotnie niższe niż w grupie kontrolnej wraz z jednoczesnym spadkiem wymiarów zewnętrznych kości. Jednak moduł elastyczności w grupie ptaków otrzymujących ochratoksynę był trzykrotnie niższy w porównaniu z grupą kontrolną. Nie przeprowadzono wówczas niestety badań histomorfometrycznych, dlatego autorzy ci nie określili parametrów aktywności komórek, stopnia mineralizacji oraz poziomu resorpcji kości. Jednym z efektów działania mykotoksyn jest zaburzenie metabolizmu wapnia i fosforu. Obecnie uważa się, że jest to związane z niedoborem witaminy D3 [129]. Jednak mechanizm tego kierunku działania ochratoksyny nie jest wyjaśniony.

Przeprowadzona w badaniach własnych analiza składu pierwiastkowego kości kurcząt wykazała różny stopień mineralizacji.

W idealnym kryształach hydroksyapatytu, stosunek Ca/P wynosi 1,67. W kościach stosunek ten jest często zaburzony, zarówno w odniesieniu do wapnia, jak fosforu i jest gatunkowo specyficzny. Dla dojrzałej owcy wynosi on 1,4, a dla świni 1,3. Często jednak w warunkach gwałtownego rozwoju stosunek ten dla owcy wynosił 2,44 i więcej (dr Kuropka - dane niepublikowane). Dlatego przyjęto, że im mniejsze jest odchylenie od wartości 1,67, tym kryształy wykazują wyższy stopień morficzności. Im odchylenie to jest większe, tym częściej hydroksyapatyt występuje w formie bezładnej-amorficznej. Zarówno w grupie kontrolnej, jak i eksperymentalnej w 10 dniu doświadczenia stopień wysycenia macierzy kostnej jest typowy dla kości pierwotnej. Morficzność hydroksyapatytu jest znacznie większa u zwierząt kontrolnych, co może oznaczać, że w grupie eksperymentalnej doszło do zaburzeń w mineralizacji. Wraz z wiekiem kurcząt morficzność wzrasta, a wysycenie macierzy jest typowe dla nowopowstałej kości. Również u ptaków 34-dniowych otrzymujących ochratoksynę obserwuje się wzrost



morficzności kryształów, jednak nadal jest on mniejszy niż u 35-dniowych ptaków grupy kontrolnej.

Parametrem obrazującym przemiany zachodzące w kościach był poziom fosfatazy zasadowej w surowicy krwi. Wyniki badań własnych wykazały podwyższony poziom fosfatazy alkalicznej w surowicy zwierząt grupy eksperymentalnej, co sugeruje, że była ona uwalniana z kości, w których procesy mineralizacji były zaburzone. Słabo zmineralizowana macierz kostna ptaków w grupie eksperymentalnej jest pod wpływem obciążeń ściskana, co powoduje znaczny spadek stopnia jej porowatości. Wzrost kości jest bardzo słaby, a późniejszy przyrost masy kości jest wywołany głównie przez aktywację osteoblastów z obszaru okostnej.

Najcenniejszym wynikiem badań własnych było wykazanie, że przy relatywnie umiarkowanych różnicach morfometrycznych, kości puszczelowe przenosiły odpowiednio trzykrotnie i pięciokrotnie mniejsze obciążenie niż kości ptaków kontrolnych.

Badanie wpływu ochratoksyny na kości puszczelowe wykazało, że znaczne zmniejszenie zdolności do przenoszenia obciążeń kości ptaków doświadczalnych spowodowane było różnicami strukturalnymi w wyniku zaburzeń proliferacji i funkcji osteoblastów związanymi z syntezą i mineralizacją tkanki kostnej.

## WNIOSKI

1. Dysfunkcja przewodu pokarmowego w przebiegu ochratoksykozy jest następstwem wzmożonej przepuszczalności bariery jelitowej oraz skrócenia i deformacji kosmków jelitowych w wyniku obniżonej aktywności proliferacyjnej krypt.
2. Ochratoksyna A powoduje zanik tkanki limfatycznej narządów układu immunologicznego (torby Fabrycjusza i śledziony) prowadząc do immunosupresji.
3. Okresowe zahamowanie przez OTA proliferacji komórek osteogennych, syntezy włókien kolagenowych oraz mineralizacji tkanki kostnej prowadzi do jej gorszego wzrostu, mniejszej sztywności i odkształceń kości.

## STRESZCZENIE

Mikotoksyny stanowią drugorzędne metabolity grzybów i wytwarzane są głównie przez grzyby z rodzaju *Aspergillus*, *Penicillium* oraz *Fuzarium*. Ze względu na znaczne rozpowszechnienie mikotoksyn w paszach i w produktach żywnościowych stanowią one poważne zagrożenie dla zdrowia ludzi i zwierząt. Jedną z ważnych mikotoksyn jest ochratoksyna A. Powoduje ona znaczne straty ekonomiczne w produkcji zwierzęcej i roślinnej. U ludzi jest przyczyną choroby zwanej endemiczną nefropatią, natomiast u trzody chlewnej wywołuje mikotoksykozową nefropatię świń. Celem badań było określenie wpływu skarmiania kurcząt brojlerów paszą zawierającą ochratoksynę A na strukturę mikroskopową narządów i tkanek oraz wpływ tych zmian organicznych na parametry kliniczne ptaków.

Badanie przeprowadzono na 30 sztukach kurcząt brojlerów Cob-500 odchowanych w warunkach fermowych. Ptaki doświadczalne otrzymywały paszę zawierającą 6 mg/kg ochratoksyny A odpowiednio przez 10 i przez 20 dni. Przeprowadzono badania sekcyjne i histologiczne narządów wewnętrznych oraz badania mikrometryczne jelita czczego, biodrowego i torby Fabrycjusza. Wykonano także badania biochemiczne krwi. Kości piszczelowe poddano badaniom morfometrycznym i biomechanicznym, a mikrosondą rentgenowską określono także ich skład pierwiastkowy. Uzyskane wyniki wskazują, że u kurcząt doświadczalnych doszło do znacznej dysfunkcji przewodu pokarmowego w wyniku zaburzenia strefy proliferacyjnej i skrócenia kosmków, a także uszkodzenia makromolekuł błony komórkowej i ścisłych połączeń między komórkami nabłonka.

W następstwie niewydolności nerek obserwowano wzrost poziomu kwasu moczowego, kreatyniny i fosfatazy alkalicznej w surowicy oraz spadek poziomu albumin. Zmiany zwyrodnieniowe i drobne nacieki zapalne obserwowano także w wątrobie. Upośledzenie przez ochratoksynę syntezy białek doprowadziło nie tylko do ograniczenia proliferacji komórek w kryptach jelitowych ale także do osłabienia proliferacji limfocytów w grudkach chłonnych torby Fabrycjusza i śledziony.

Badania kości piszczelowej kurcząt doświadczalnych wykazały zaburzenie wytwarzania tkanki kostnej wyrażające się mniejszą zdolnością do przenoszenia obciążeń.

## SUMMARY

Mycotoxins are secondary fungus metabolites mainly produced by *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fuzarium* species of fungi. Mycotoxins are commonly present in fodder and in food products, and cause a danger for people and animals. One of the most important mycotoxins is ochratoxin A. Ochratoxin A cause significant economic losses in animals and plant production. In people they cause endemic nephropathy and in pigs mycotoxic nephropathy.

The aim of the present study was to determine the influence of chicken feed with which contain ochratoxin A on microscopic structure of organs and tissues and the influence of these changes on clinical parameters.

The examinations were carried out on 30 Cob-500 broiler chickens housed on a farm. The experimental birds were fed the fodder containing ochratoxin A (6 mg/kg) for 10 and 20 days. The necropsy and histological examination of internal organs and micrometric examinations included the jejunum, ileum and bursa Fabricii were done. Clinical biochemistry blood tests were conducted. Tibial bones were subject to morphometric and biomechanic examination and composition of chemical elements were determined with RTG-microprobe.

The result obtained reveal marked dysfunction of the digestive tract resulting from the proliferative zone disturbances and villus atrophy as well as damage of macromolecules of the cell membrane and intercellular tight junction. Kidney insufficiency increased the level of uric acid, creatinine and alkaline phosphatase and decreased in of albumin concentration in blood serum. Degenerative changes and moderate inflammatory infiltration were also found in the liver. Protein synthesis defect caused by ochratoxin not only decreased the capacity of intestinal crypt proliferation, but also diminished the proliferation and differentiation of lymphatic tissue cells in bursa Fabricii and the spleen. The examinations of the tibial bones showed disturbances in bone tissue formation exhibited by reduced load carrying ability.

## PIŚMIENNICTWO

1. Abarca M. L., Accensi. F., Bragulat. M. R., Castella. G., Cabanes. F. J.: *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J. Food Prot.* 2003, 66, 3, 504-506.
2. Abdelraheim M. A. Meki., Ahmed. A. A. Hussein.: Melatonin reduces oxidative stress induced by ochratoxin A in rat liver and kidney. *Comp. Bioch. Physiol.* 2001, 130, 305-313.
3. Abid S., Hassen. W., Achour. A., Skhiri. H., Maaroufi. K., Ellouz. F., Creepy. E., Bacha. H.: Ochratoxin A and human chronic nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? *Hum. Exp. Toxicol.* 2003, 22, 2, 77- 84.
4. Alvarez L., Gil. A. G., Ezpeleter. O., Garcia. J. A., Lopez de Cerein. A.: Immunotoxic effects of ochratoxin A in wistar rats after oral administration. *Food. Chem. Toxicol.* 2004, 42, 5, 825- 834.
5. Anati L. A. L., Petzinger. E.: Immunotoxic activity of ochratoxin A. *J. Vet. Pharmacology and Therapeutiques.* 2006, 29, 2, 79- 90.
6. Aravind K. L., Patil. V. S., Devegowda. G., Umakantha. B., Ganpule. S. P.: Efficacy of esterified glucomannan to counteract mycotoxicosis in naturally contaminated feed on performance and serum biochemical and hematological parameters in broilers. *Poult. Sci.* 2003, 82, 4, 571- 576.
7. Arsenovic A., Bucvic. D., Trobojević. S., Mavić. I., Djukanovic. L.: Detection of renal dysfunction in family members of patients with Balkan endemic nephropathy. *Am. J. Nephrol.* 2005, 25, 50- 54.
8. Aydin G., Ozcelic. N., Cicek. E., Soyoz. M.: Histopathologic changes in liver and renal tissues induced by ochratoxin A and melatonin in rats. *Hum. Exp. Toxicol.* 2003, 22, 7, 383- 391.
9. Bailey C. A., Gibson. R. M.: Impact of L-phenylalanine supplementation on the performance of three weeks olds broilers fed diets containing ochratoxin A. Effects on haematology and clinical chemistry. *Poult. Sci.* 1990, 69, 420- 425.
10. Barisic K., Petric. J., Rumora. L., Ceplak. I., Grubisic. T. Z.: Expression of Hsp 70 in kidney cells exposed to ochratoxin A. *Arch. Toxicol.* 2002, 76, 4, 218- 226.
11. Baudrimont A. M., Betbeder., Creppy. E. E.: Reduction of the ochratoxin A induced cytotoxicity in vero cells by aspartame. *Arch. Toxicol.* 1998, 71, 390-398.
12. Belmadani A., Tramu. G.: Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Arch. Toxicol.*, 1998, 72, 656- 662.
13. Biro. K., Barna-Vetra I., Pecsí T., Szabo E., Winkler G., Gremmels F. J., Solti. : Evaluation of spermatological parameters in ochratoxin A- challenged boars. *Theriogenology.* 2003, 60, 2, 199- 207.
14. Biro K., Solti L., Vetro I. B., Glavits R.: The distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian. Pathol.* 2002, 31, 141- 148.
15. Blank R., Rolfs J. P., Sudekum K. H., Frochlich A. A., Marquardt R. R., Wolfram. S.: Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood vessels and excretion of the mycotoxin in sheep. *J. Agric. Food. Chem.* 2003, 51, 23, 6899- 6905.
16. Bouhet S., Oswald i. p.: The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell- derived innate immune response. *Vet. Immunology and immunopathology*, 2005, 108, 199- 209.
17. Brochard G., Le Bacle C.: *Mycotoxines en milieu du travail.* INRS. 2009, 119, 3, 299- 323.
18. Burck H. C.: *Technika histologiczna.* PZWL- 1973, Warszawa.

19. Burckhardt B. C., Burchardt G.: Transport of organic anions across the basolateral membrane of proximal tubules cells. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2003, 95, 146-158.
20. Campbell M. I., May J. J. D., Huff W. E.: Evaluation of immunity of young broilers chickens during simultaneous aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Poult. Sci.* 1983, 62, 2138- 2144.
21. Chang C. F., Huff E. E., Hamilton P. B.: A leucocytopenia induced in chickens by dietary ochratoxin A. *Poult. Sci.* 1979, 58, 555- 558.
22. Corrier D. E.: Mycotoxicosis: mechanism of immunosuppression. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 30, 73- 87.
23. Creppy E. E., Baudrimont I., Anne. Marie.: How aspartame prevents the toxicity of ochratoxine A. *J. Toxicol. Sci.* 1998, 23, 2, 165-172.
24. Creppy E. E., Chaker K.: The mycotoxin ochratoxin A is a substrat for phenylalanine hydroxylase in isolated rat hepatocytes and in vivo. *Arch. Toxicol.* 1990, 64, 279-284.
25. Creppy E. E., Kane A., Giessen E., Roth A.: Effect of ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells. *Arch. Toxicol. Suppl.* 1986, 9, 310- 314.
26. Devendra S. V.: Effects of mycotoxins on the bone structure and leg weakness in poultry: estimation of the economic loss by leg weakness. *BioMin India.* 2007.
27. Duff S. R., Burns R. B., Dwivedi P.: Skeletal changes in broilers chicks and turkey poult fed diets containing ochratoxina A. *Res. Vet. Sci.* 1987, 43, 3, 301- 307.
28. Dwivedi P., Burns R. B.: Effect of ochratoxine A on immunoglobulins in broilers chicks. *Res. Vet. Sci.* 1984, 36, 117-121.
29. Dwivedi P., Burns R. B.: Immunosuppressive effects of ochratoxin A in young turkeys. *Avian Pathology.* 1985, 14, 213- 225.
30. Elarousi M. A., Mohamed F. R., Elbarkousy F. R., Atta A. M., Abdou A. M., Hattab M. H.; Experimental ochratoxicosis in broilers chickens. *Avian Pathol.* 2006, 35,4, 263-269.
31. Elissalde M. H., Ziprin. R. L., Huff W. E., Kubena L. F.: Effect of ochratoxin A on Salmonella challenged broilers chickens. *Poult. Sci.* 1994, 73, 1241-1248.
32. Fantini J., Maresca M., Hammache D., Yahi N., Delezay O.: Glicosphingolipid(GSL) microdomains as attachment platforms for host pathogens and their toxins on intestinal epithelial cells: activation of signal transduction pathways and perturbations of intestinal absorption and secretion. *Glycoconjugate Journal*, 2000, 17, 173-179.
33. Faucet-Marquis V.: Ochratoxine A, contaminant alimentaire, est-elle un cancerogene genotoxique? Recherché des effets genotoxiques par la technique de post marquage de I,AND au 32 P en relation avec la metabolisation de I,ovchratoxine A. *Inst. Nat. Pol. Toulouse.* 2005.
34. Fuchs R., Peraica M.: Ochratoxin A in human kidney diseases. *Food. Add. Cont. Supp.* 2005, 1, 53- 57.
35. Fukata T., Sasai K., Baba E., Arakawa A.: Effect of ochratoxin A on Salmonella typhimurium challenged layer chickens. *Avian Dis.* 1996, 40, 924- 926.
36. Gajęcka M., Jakimiuk E., Skorska-Wyszyńska E., Zielonka Ł., Polak M., Paluszewski A., Rybarczyk L., Gajęcki M.: Influence of zearalenone micotoxicosis on selected immunological, haematological and biochemical index of blood plasma in bitches. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004, 7, 3, 175-180.
37. Galtier P., Alvinerie M., Charpentreau J. L. .: The pharmacokinetic profiles of ochratoxin A in pigs, rabbits and chickens. *Food. Cosmetic. Toxicology.* 1981, 19, 735- 738.

38. Gautier J. C., Holzhaeuser D., Marković J., Gremaud E., Schilter B., Turesky R. J.: Oxidative damage and stress response from ochratoxin A exposure in rats. *Free Radical Biology & Medicine*. 2001, 30, 10, 1089-1098.
39. Gekle M., Miedenberger S., Freudinger R., Silbernagl S.: The mycotoxin ochratoxin A impairs protein uptake in cells derived from the proximal tubule of the kidney (opossum kidney cells). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1994, 271, 1-6.
40. Gentles A., Smith E. E., Kubena L. F., Duffus E., Johnson P., Thompson J., Harvey R. B., Edrington T. S.: Toxicological evaluation of cyclopiasonic acid and ochratoxin A in broilers. *Poult. Sci.* 1999, 78, 1380-1384.
41. Gharbi A., Trillon O., Betbeder A. M., Counord J., Gauret M. F., Pfohl-Leszkowicz A., Dirheimer G., Creppy E. E.: Some effects of ochratoxin A, a mycotoxin contaminating feeds and foods, on rat testis. *Toxicol.* 1993, 25, 83, (1-3), 9-18.
42. Gibson R. M., Bailey C. A.: Ochratoxin A and dietary protein effect on body weight, feed conversion, relative organ weight and mortality in three week old broilers. *Poult. Sci.* 1989, 68, 1658-1663.
43. Girish C. K., MacDonald E. J., Scheinin M., Smith T. K.: Effects of feedborne fuzarium mycotoxins on brain regional neurochemistry of turkeys. *Poult. Sci.* 2008, 87, 1295-1302.
44. Girish C. K., Smith T. K.: Effects of feeding blends of grains naturally contaminated with fuzarium mycotoxins on small intestinal morphology of turkeys. *Poult. Sci.* 2008, 87, 1075-1082.
45. Golinski P.: Ochratoxyna A w organizmie ludzkim jako wynik zanieczyszczenia żywności i pasz. *Zeszyty Naukowe AR Poznań*, 1987, 1-62
46. Haazle M., Guenter W., Marquardt R. R., Frohlich A. A.: Beneficial effects of dietary ascorbic acid supplement on hens subjected to ochratoxin A toxicosis under normal and high ambient temperatures. *Can. J. Anim. Sci.* 1993, 73, 149-157.
47. Haubeck H. D., Lorkowski G., Kolsch E., Roschenthaler R.: Immunosuppression by ochratoxin A and its prevention by phenylalanine. *Appl. Env. Microbiol.* 1981, 41, 4, 1040-1042.
48. Haubruge E., Chasseur C., Mathieu F., Begaux F., Malaisse F., Nolard N., Zhu D., Suetens C., Gaspar C.: La maladie de Kashin-Beck et le milieu rural au Tibet: un problème agri-environnemental. *Cahiers Agricultures*. 2000, 9, 117-24.
49. Holmberg T., Breitholtz E. A., Haggblom P., Schan O., Hult K.: *Penicillium verrucosum* in feed of ochratoxin A positive swine herds. *Mycopathology*. 1991, 116, 169-176.
50. Huff W. E., Doerr J. A.: Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poult. Sci.* 1981, 60, 550-555.
51. Huff W. E., Hamilton P. B.: Decreased plasma carotenoids during ochratoxicosis. *Poult. Sci.* 1975, 54, 1308-1310.
52. Huff W. E., Kubena L. F., Harvey R. B.: Progression of ochratoxicosis in broiler chicks. *Poult. Sci.* 1988, 67, 1139-1146.
53. Huff W. E., Wyatt R. D., Tucker T. L., Hamilton P. B.: Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult. Sci.* 1974, 53, 1585-1591.
54. Huff W. E., Doerr J. A., Hamilton P. B., Hamann D. D., Peterson R. E., Ciegler A.: Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Appl. Env. Microbiol.* 1980, 40, 1, 102-107.
55. Kimaryamma C., Krishnannair. M.: Ultrastructural pathology of the kidney in experimental ochratoxicosis in goats. *Indian. J. An. Sci.* 1990, 60, 6, 623-627.

56. Koynarski V., Stoev S. D., Grozeva N., Mirtcheva T.: Experimental coccidiosis provoked by *Eimeria adenoids* in turkey poult given ochratoxin A. *Vet. Arhiv.* 2007, 77, 2, 113- 128.
57. Kozaczyński W.: Experimental ochratoxicosis A in chickens immunological studies. *Bull. Vet. Inst.* 1994, 38, 1- 8.
58. Kroch P.: Role of ochratoxin in disease causation. *Food. Chem. Toxicol.* 1992, 30, 3, 213- 224.
59. Kubena L. F., Harvey W. E., Corrier D. E.: Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broilers chickens. *Poult. Sci.* 1989, 68, 867- 872.
60. Kubena L. F., Huff W. E., Harvey R. B., Corrier D. E.: Influence of ochratoxin A and deoxynivalenol on growing broilers chicks. *Poult. Sci.* 1988, 67, 253- 260.
61. Kuiper-Goodman T., Scott. P. M. : Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A. *Biomed. Env. Sci.* 1989, 2, 3, 179-248.
62. Kumar A., Jindald N., Shukla C. L., Yashpal- Ledoux D. R., Rottinghaus G. E.: Effect of ochratoxin A on *Escherichia coli*- challenged broilers chicks. *Avian dis.* 2003, 47, 2, 415- 424.
63. Kuramochi G., Gekle M., Silbernagl S.: Ochratoxin A disturbs pH homeostasis in the kidney: increases in pH and  $\text{HCO}_3^-$  in the tubules and vasa recta. *Pflugers-Arch.* 1997, 434 (4), 392-7.
64. Leibetseder J.: Znaczenie mykotoksyn u bydła i świń. *ProAnimali.* 1997. VII, 5-13.
65. Lewis C. W., Smith J. E., Anderson J. G., Freshney R.: Increased cytotoxicity of food-borne mycotoxins toward human cell lines in vitro via enhanced cytochrome P450 expression using the MTT. *Bioassay Mycopathol.* 1999, 148, 2, 97- 102.
66. Li S., Marquadt R. R., Frohlich A. A., Vitti T. G., Crow G. : Pharmacokinetics of ochratoxin A and it's metabolites in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1997, 145, 82- 90.
67. Li Y.C., Ledoux D.R., Bermudez A. J., Fritsche K. L., Rottinghaus G. E.: Effects of moniliformin on performance and immune function of broilers chicks. *Poult. Sci.* 2000, 79, 26- 32.
68. Luhe A., Hildebrand H., Ute B., Dingermann T., Jurgenahr H.: A new approach to studying ochratoxin A (OTA)- induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol. Sci.* 2003, 73, 315- 328.
69. Luster M. I., Germolec D. R., Burleson G. R.: Selective immunosuppression in mice of natural killer cells activity by ochratoxin A. *Cancer. Res.* 1987, 47, 2259- 2263.
70. Maaroufi K., Abid S., Cherif A., Achour A., Zakhama A., Creepy E. E., Bacha H.: Molecular aspects of human ochratoxicosis in Tunisia. *J. Toxicol.* 1999, 18, 263- 76.
71. Manning R. O., Wyatt R. D.: Toxicity of *Aspergillus ochraceus* contaminated wheat and different chemical forms of ochratoxin A in broilers chicks. *Poult. Sci.* 1984, 63, 458- 465.
72. Maresca. M., Mahfoud R., Pfohl-Leszkowicz A., Fantini J.: The mycotoxin alters intestinal barrier and absorption functions but has no effect on chloride secretion. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001, 176, 1, 46- 54
73. Marquardt R., Frohlich A.: A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J. Anim.* 1992, 70, 3966- 3988.
74. Mazurkiewicz M.: red. Choroby drobiu. *Wyd. Akad. Rol. Wroc.* 2005, 692-695.
75. Mc Laughlin J., Padfield P. J., Burt J. P. H., O'Neil C. A.: Ochratoxine A increases permeability through tight junction by removal of specific claudin isoforms. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2004, 287, 5, 1412.



76. Meissonier G. M., Oswald I. P., Galtier P.: Aflatoxines chez le porc- etude bibliographique de donnees cliniques et experimentales. *Rev. Med. Vet.* 2005, 156, 12, 591- 605.
77. Michael G. J., Thaxton P., Hamilton P. B.: Impairment of the reticuloendothelial system of chickens during aflatoxicosis. *Poult. Sci.* 1973, 52, 1206- 1207.
78. Mortensen G. K., Hald B., Madsen A.: Ochratoxin A contaminated barleys for sow and piglets: pig performances and residues in milk and pigs. *Acta. Agric. Scand.* 1983, 3, 352
79. Muller. G., Rossner. H., Rohrmann. B., Erler. W., Geschwend. G., Grafe. U., Burkert. B., Moller. U., Diller. R., Sachse. K., Kohler. H.: Effects of the mycotoxin ochratoxin A and some of it's metabolites on the human cell line THP-1. *Toxicol.* 2003, 14, 184, 1, 69-82.
80. Nedeljković J., Sinovec S., Sinovec Z.: Patomorphological alterations and reperatory processes in the kidneys of broilers treated with ochratoxin A. *Acta. Vet. Beograd.* 2001, 5, 5- 6, 333- 342.
81. Nedeljković J., Trailovic J. S.: Blood serum protein of broilers exposed to prolonged treatment with a low dose of ochratoxin A. *Acta. Vet. Beograd.* 2000, 50, 1, 13- 22.
82. Niemiec J.: Wpływ ochratoksyna A na przebieg wzrostu, produkcję i reprodukcję kur. *Rozprawy Naukowe i Monografie. Wyd. SGGW. W-wa.* 1991, 135.
83. Nusrat A., Parkos C. A., Verkade P., Foley C.S., Liang T. W., Innis-Whitehouse W., Eastbum K. K., Madara J. L.: Tight junctions are membrane microdomains. *J. Cell Sci.* 2000, 113, 1771-1781.
84. Oswald I. P., Marin D. E., Bouhet S., Pinton P., Taranu I., Accensi F.: Immunotoxicological risk of mycotoxins for domestic animals. *Food. Add. Cont.* 2005, 22, 354- 360.
85. Oswald I. P.: Effects immunosupresseurs des mycotoxines chez le porc. *Journees Recherche Porcines.* 2007, 39, 419- 426.
86. Patil. R. D., Scholar. D., Degloorkar. N. M., Moregaonkar. S.D., Kulkarni. G.B.: Ameliorative efficacy of bantox in induced ochratoxicosis in broilers: a haemato-biochemical studies. *Ind. J. Vet. Pathol.* 2005, 29,2.
87. Prior M. G., Oneill J. B., Sisodia C. S.: Effects of ochratoxicosis A on growth response and residues in broilers. *Poult. Sci.* 59, 1254-1257, ?/
88. Raina J. S., Roy K. S., Singh B.: Biochemical and histochemical studies in experimental mycotoxicosis in chicks. *Int. J. Anim. Sci.* 1991, 62, 2, 1276-1281.
89. Raju M. V. L. N., Devegowda.: Influence of esterified glucomannan on performance and organ morphology, serum biochemistry and haematology in broilers exposed to individual and combined mycotoxicosis (aflatoxin, ochratoxin, and T-2 toxin) *British. Poult. Sci.* 2000, 41, 640- 650.
90. Ralf B., Rolfs J. P.: Effects of chronic ingestion of ochratoxin A on blood levels and excretion of the mycotoxin in sheep. *J. Agric. Chem.* 2003, 51, 6899- 6905.
91. Reboux G.: Mycotoxines effets sur la sante et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Francaises D'allergologie et immunologie Clinique.* 2006, 46, 3, 208- 212.
92. Rotter R. G., Frochlich A. A., Marquardt R. R.: Influence of dietary charcoal on ochratoxin A in toxicity in leghorn chicks. *Can. J. Vet. Res.* 1988, 53, 449-453.
93. Rouvier M.: Ochratoxine A: nature, origine et toxicite. *Univ. Paul. Sabatier* 2002
94. Santin E., Antonia C.: The effects of ochratoxin/ aluminosilicate interaction on the tissues and humoral immune response of broilers. *Avian Pathology,* 2002, 31, 73- 79.

95. Sauvant C., Silbernagl S., Gekle M.: Exposure to ochratoxin A impairs organic anion transport in proximal tubule derived opossum kidney cells. *J. Pharm. Exp. Thera.* 1998, 287, 1, 13- 20.
96. Schaff G. J., Niejmeijer S. M.: The role of oxidative stress in the ochratoxin A mediated toxicity in proximal tubular cells. *Biochemical Biophys. Acta.* 2002, 1588, 149- 58.
97. Schramek H., Wilflingseder D., Pollack V., Freudinger R., Mildenerger S., Gekle M.: Ochratoxine A induced stimulation of extracellular signal- regulated kinases1/2 is associated with madin-darby canine kidney- c7 cell differentiation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, 283, 3, 1460-1468.
98. Sen- Itiroh H.: Cell adhesion/ recognition and signal transduction through glycosphingolipid microdomain. *Glycoconjugate J.* 2000, 17, 143-151.
99. Shlosberg A., Elkin N., Mertyn M., Uni O., Vera H., Eitan B., Weisman Y., Meroz M., Rachel B.: Severe hepatopathy in geese and broilers associated with ochratoxin A in their feed. *Mycopathology.* 1997, 138, 71- 6.
100. Sołtysiak Z., Rouibah K.: Zmiany neuropatologiczne w ośrodkowym układzie nerwowym kurcząt po zatruciu ochratoksyną A. *Med. Vet.* 2005, 61, 5.
101. Stefanovic V., Toncheva D., Atanasova S.: Etiology of Balkan Endemic Nephropathy and associated urothelial cancer. *Am. J. Nephrol.* 2006, 26, 1-11.
102. Stoev S. D., Anguelov G.: Influence of ochratoxin A and extract of artichoke on the vaccinal immunity and health in broilers chicks. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2000, 52, 43-55.
103. Stoev S. D., Daskalov H., Bozica R., Domijan A. m.: Spontaneous mycotoxic nephropathy in Bulgarian chickens with unclarified mycotoxic aetiology. *Vet. Res.* 2002, 33, 83- 93.
104. Stoev S. D., Gondaszewa D., Mirtcheva T., Mantle P. G.: Susceptibility to secondary bacterial infections in growing pigs as an early response in ochratoxicosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2000, 52, 287- 296.
105. Stoev S. D., Anguelov G.: Haematological, biochemical and toxicological investigations in spontaneous cases with different frequency of porcine nephropathy in Bułgaria. *J. Vet. Med.* 1998, 45, 229- 236.
106. Stoev S. D.: The role of ochratoxin A as a possible cause of BEN and its risk evaluation. *Vet. Human. Toxicol.* 1998, 40, 6.
107. Stoev S., Anguelov G., Pavlov D.: Some antidotes and paraclinical investigations in experimental intoxication with ochratoxicosis and penicilic acid in chicks. *Vet. Arch.* 1999, 69, 4, 179- 89.
108. Stoev S. D., Paskalev M.: Experimental one year ochratoxin A toxicosis in pigs. *Exp. Toxicol. Pathol.* 2002, 53, 481- 487.
109. Stormer F. C., Storen O., Hansen C. E., Pedersen J. I.: Formation of 4R-and 4S-4-Hydroxyochratoxin A and 10- hydroxyochratoxin A from ochratoxin A by rabbit liver microsomes. *Appl. Env. Microbiol.* 1983, 45, 4, 1183- 1187.
110. Sungsoo C. L., Berry J. T., Chu F. S.: Immunohistochemical fete of ochratoxin A in mice . *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1984, 72, 218- 227.
111. Susumu K.: Intestinal absorption and excretion of aflatoxin in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1989, 97, 88- 97.
112. Susumu K., Kageaki A.: Intestinal absorption and secretion of ochratoxin A in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982, 64, 94- 102
113. Szczech G. M., Carlton W. W., Tiute J.: Ochratoxicosis in Beagle Dogs. *Vet. Path.* 1973, 10, 135- 154.

114. Szczech G. M., Carlton W. W., Tiute J.: Ochratoxicosis in Beagle Dogs. *Vet. Path.* 1973, 10, 219- 231.
115. Szczech G. M., Carlton W. W., Tuite J., Caldwell R.: Ochratoxine A Toxicosis In swine. *Vet. Path.* 1973, 10, 347- 364.
116. Thaxton J. P., Tung H. T., Hamilton P. B.: Immunosuppression in chickens by aflatoxin. *Poult. Sci.* 1974, 53, 721- 25.
117. Thuvander A., Dahl P., Breitholtz E. A.: Influence of perinatal ochratoxin A exposure on the immune system in mice. *Nat. Toxins*, 1996, 4, 4, 174- 180.
118. Timm A., Weber D. : Physiological and molecular aspects of ochratoxin A biosynthesis. *Biomedical and Life Science*. 2009, 15, 353- 76.
119. Tor L., Sten K., Stormer F. c.: Mechanism of ochratoxicosis A induced immunosuppression. *Mycopathology*, 1989, 107, 153- 59.
120. Vacher V. L., Izzedine H., Svetlana K., Hulot J. S., Baumelou A., Deray G.: Renal tubular drug transporters. *Nephron Physiol.* 2006, 103, 3, 97-106.
121. Van der Merwe K. j., Steyn P. S., Fourie L., Scott D. B., Theron J. J.: Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus*. *Nature*. 1965 b. 205, 112-1113.
122. Waldenstedt L.: Nutritional factors of importance for optimal leg health in broilers. *A Review. Anim. Feed. Sci. Technol.* 2006, 126, 3- 4, 291-307.
123. Wang G. H., Xue C.Y., Chen F., Ma Y. L., Zhang X. B., Bi Y. Z., Cao Y. C.: Effects of combinations of ochratoxin A and T-2 toxin on immune function of yellow feathered broilers chickens. *Poult. Sci.* 2009, 88, 504- 510.
124. Wangikar P. B., Dwivedi P., Sharma A. K., Sinha N.: Effects in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. II Histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses. *Birth. Defects. Res.* 2004, 71, 352- 358.
125. Warren M. F., Hamilton B. p.: Intestinal fragility during ochratoxicosis and aflatoxicosis in broilers chickens. *Appl. Env. Microbiol.* 1980, 641- 645.
126. Warren M. F., Hamilton P. B.: Glycogene storage disease type x caused by ochratoxin A in broilers chickens. *Poult. Sci.* 1981, 60, 120-123.
127. Warren M. F., Hamilton P. B.: Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Appl. Env. Microbiol.* 1980, 522- 525.
128. Warren M. F. Hamilton P. B.: Inhibition of the glycogen phosphorylase system during ochratoxicosis in chickens. *Appl. Env. Microbiol.* 1980, 522-525.
129. Whitehead C. C.: The role of vitamin D metabolites in the prevention of tibial dyschondroplasia. *An. Feed. Sci. Technol.* 1995, 53, 205- 210.
130. Wiśniewska-Dymytrov H.: Immunosupresyjne działanie mikotoksyn u drobiu. *Materiały Konferencji: Immunosupresja i immunomodulacja układu odpornościowego ptaków – możliwość immuno-profilaktyki. Polanca-Zdrój.* 2003.
131. Yiannikouris A., Jouany J. P.: Les mycotoxines dans les aliments des ruminants, leur devenir et leurs effets chez l'animal. *INRA. Prod. Anim.* 2002, 15,1, 3-16.
132. Zepnik H., Volkel W., Dekant W.: Toxicokinetics of the mycotoxin ochratoxine A in F 344 rats after oral administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2003, 192, 1, 36- 44.
133. Zingerle. M., Silbernagle. S., Gekle. M.: Reabsorption of the nephrotoxin Ochratoxine A along the rat nephron in vivo. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1997, 280, 1, 220-224.
134. Zinkovic G. R. ., Nenad M. ., Zivanov J., Zivković Z., Milojević M.J., Teodosin. J.M., Savko. L., Pecanac. D., Milić. V., Aleksandra. S., Bocarov. S., Dekić. J. P.: Mycotoxins and their impact on poultry production. *Proc. Nat. Sci, Matica. Srpska. Novi. Sad.* 2005, 108, 197- 205.

135. Zoran B., Vjekoslav D., Mladen B., Agnjen K., Skljarov I.: Balkan endemic nephropathy: Stil mysterious disease. *European. J. Epidemiology.* 1995, 11, 235- 238.