

Česká zemědělská univerzita v Praze

Fakulta agrobiologie, potravinových a přírodních zdrojů

Katedra veterinárních disciplín



Vliv nízkých dávek zearalenonu na fertilitu prasniček

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: Doc. MVDr. Radko Rajmon, Ph.D.

Autor diplomové práce: Bc. Petra Melicharová

Datum odevzdání diplomové práce: duben 2009

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci na téma: Vliv nízkých dávek zearalenonu na fertlitu prasniček vypracovala samostatně a použila jen pramenů, které cituji a uvádím v přiložené bibliografii.

V Praze dne:

Petra Melicharová

Poděkování

Touto cestou bych chtěla poděkovat doc. MVDr. Radko Rajmonovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a ochotu a trpělivost při spolupráci na diplomové práci.

Petra Melicharová

AUTORSKÝ REFERÁT

Hospodářská zvířata jsou ovlivňována látkami s estrogenními účinky z prostředí, nejčastěji potravním řetězcem. Zaplísňené krmivo může obsahovat estradiolu podobný mykotoxin zearalenon, jenž může způsobovat velké potíže v produkci a reprodukci zvířat. Jeho působení závisí jak na druhu toxinu, tak na přijatém množství toxinu, délce zkrmování, individualitě zvířete, pohlaví, plemeni a výživovém stavu. Zearalenon je mimořádně stabilní organická látka a jeho toxicita nebývá běžnou úpravou krmiv podstatně snížena. Biotransformace zearalenonu probíhá především v játrech. Jeho hlavními metabolity jsou α - a β - zearalenol a jejich glukuronované konjugáty. α - a β - zearalenol jsou schopny dále oxidovat za vzniku dalších derivátů, mezi které patří α - zearalanol (zeranol) a β - zearalanol (taleranol). Obě tyto sloučeniny pak dále podléhají redukci za vzniku jiného velmi důležitého metabolitu, kterým je zearalanon. Nízké dávky zearalenonu způsobují chronické intoxikace, které mohou probíhat bez zjevných změn klinického stavu. Nejvíce citlivými hospodářskými zvířaty jsou prasata, zejména prasničky před dosažením puberty. Při vysokých dávkách zearalenonu dochází k estrogenizaci prasnice, mohou se objevit edémy, prolapsy, uterotrofní účinky a jiné změny v reprodukčním traktu. Účinky zearalenonu jsou dnes víceméně prostudované, ale výzkum byl více zaměřen na efekt vyšších dávek zearalenonu než na jeho účinek v nízkých dávkách. Cílem práce bylo experimentálně ověřit vliv nízkých dávek zearalenonu na zabřezávání prasniček a na ranný vývoj konceptů.

Do experimentu bylo zařazeno 4 x 9 chovných prasniček. Skupina I – krmná směs s vyšším obsahem sóji a doplňkem genisteinu, skupina II – krmná směs s vyšším obsahem sóji, doplňkem genisteinu a zearalenonu, skupina III – krmná směs bez sóji (nahrazena rybí moučkou) a doplňkem zearalenonu a skupina IV – krmná směs bez sóji. 14 dnů před očekávanou říjí byla u poloviny zahájena medikace nízkou dávkou zearalenonu per os. Ve zjištěné říji byla zvířata inseminována a po zjištění březosti byla medikace 22. - 26. den od inseminace ukončena. Cca 56. - 63. den byla zvířata odporažena. Byla zhodnocena hmotnost ovarií, počet žlutých tělísek, hmotnost intaktní dělohy a hmotnost dělohy bez selat, hmotnost plodových obalů a plodových vod, hmotnost a počet selat a embryonální mortalita. Výsledky byly vyhodnoceny standardními statistickými metodami (Statistica 8,0, Statsoft).

Vícerozměrná analýza rozptylu (MANOVA) na základě společného zhodnocení sledovaných proměnných (počet žlutých tělísek, hmotnost vaječníků, hmotnost dělohy, hmotnost plodových obalů, počet selat, hmotnost selat, průměrná hmotnost selete) prokázala mezi skupinami prasnic statisticky významný rozdíl. I když v jednotlivých parametrech rozdíly nebyly tak výrazné, lze usuzovat, že medikační schéma významně ovlivnilo sledované ukazatele.

Zabřezávání bylo významně vyšší ($p < 0,05$) ve skupinách krmených zearalenonem (zabřezlo 16 z 18 prasnic) narozdíl od skupin krmených jen sójou (zabřezlo 6 z 9 prasnic) a nebo pouze moučkou (zabřezlo 5 prasnic z 9). Zvířata medikovaná Zea také častěji zabřezla po 1. inseminaci, rozdíly v úspěšnosti inseminace byly opět signifikantní. Počet ovulovaných folikulů vyjádřený počtem žlutých tělísek (CL) byl významně vyšší ve skupinách se zearalenonem, stejně jako rozdíl mezi počtem CL a počtem plodů.

Ve skupinách krmených sójou a zearalenonem a sójou jsme zaznamenali okrsky edematozní děložní sliznice. Ve všech skupinách jsme zaznamenali zbytky plodových obalů, svědčící o embryonální mortalitě. S ohledem na rozdílný stupeň rozkladu ovšem nebylo možno stanovit přesný počet odumřelých zárodků. Pro odhad stupně embryonální mortality byl stanoven jednak rozdíl počtu CL a selat, jednak podíl počtu selat a CL. Zatímco první ukazatel byl významně vyšší u skupin ošetřených Zea, ve druhém jsme zjistili pouze statisticky neprůkaznou tendenci.

Rozdíly v parametrech „počet selat, „hmotnost selat“, „průměrná hmotnost selete“, „hmotnost dělohy, plodových obalů a vod“ byly statisticky neprůkazné. U většiny se ale projevila tendence k nejvyšším hodnotám ve skupině Zea + Sója a naopak k nejnižším ve skupině Zea + Moučka.

Zdá se, že použitá velmi nízká dávka zearalenonu působila na některé parametry reprodukční výkonnosti prasniček spíše stimulačně. Současně jsme pozorovali tendence k opačnému efektu u krmné směsi se sojou krmné směsi s rybí moučkou. To je v souladu s poznatky o duálním působení řady xenoestrogenů v závislosti na dávce a hormonálním profilu plemenic.

Klíčová slova: estrogenní účinky, prasnice, zearalenon, nízké dávky zearalenonu.

AUTHOR 'S REPORT

Livestock is affected by substances with oestrogenic effects mainly from food. Moldy feeds may contain estradiol-like mykotoxin zearalenone, which can cause serious problems in the production and reproduction of animals. Its effect depends on the kind and quantity of the toxin, duration of feeding, animal individuality, gender, breed and nutritional status. Zearalenone is an extremely stable organic substance, and its toxicity is not substantially reduced by normal modification of feed. Zearalenone biotransformation takes place mainly in the liver. The main metabolites are α - and β - zearalenol and glucuron conjugates. α - and β - zearalenol are capable of oxidizing into other derivatives, including α - zearalanol (zeranol) and β - zearalanol (taleranol). Both these compounds are further reduced to another very important metabolite of zearalanone. Low doses of zearalenone cause chronic poisoning, which can occur without obvious changes in clinical status. The most sensitive livestock are pigs, mostly sows before reaching puberty. High doses of zearalenone cause estrogenism in sows, which means the enlargement of the mammary gland, redness, swelling and prolapse of the vagina, and also increase in the size and weight of the ovaries with atrophy of the ovaries at a later stage. There Uterotrophic effects are also known, where the uterus is enlarged because there is a proliferation of mucosa and musculature. The effects of zearalenone are more or less well known, but this research concentrated mostly on the effect of higher doses of zearalenone than its effect in low doses. The aim of this work was to experimentally verify the effect of low-doses zearalenone on gilts pregnancy and the early development of concepts.

Four groups of nine breeding gilts were included in the experiment. Group I - feed mixture with increased soya content + additional genistein; group II – mixture with increased soya content + additional genistein + Zea medication; group III – mixture without soya(replaced with fish meal) + Zea medication; group IV – mixture without soya, only fish meal. The oral medication of the animals with low doses of zearalenone began 14 days before the expected oestrus. The animals in oestrus were inseminated and after pregnancy detections the medication is terminated on the 22nd – 26th day after insemination. The animals were killed on the 56th - 63rd day. The weight of the ovaries, the number of corpora lutea, the weight of the uterus intact and without piglets , fetal weight and fetal water packaging, the weight and number of piglets and embryonic mortality were all evaluated using standard statistical methods (Statistica 8,0, Statsoft).

Multidimensional analysis of variance (Manova) on the basis of a common assessment of controlled variables (the number of corpora lutea, the weight of the ovaries, uterus weight, fetal weight of packaging, weight and number of piglets and average piglet weight) between groups of pigs showed a statistically significant difference. Although differences in individual parameters were not as pronounced, suggests that medication chart significantly affect the characteristics.

Pregnancy was significantly higher ($p < 0.05$) in groups fed medication zearalenone (pregnant 16 of 18 sows), unlike groups fed only sojou (pregnant 6 of 9 sows) or a meal (pregnant 5 sows from 9). Animals medicated Zea also frequently pregnant after 1 insemination, the differences in the success of insemination were again significant. Number of follicles ovulation expressed by corpora lutea was significantly higher in groups with zearalenone, as well as the difference between the number of corpora lutea and number of fetus.

In the groups fed soya and zearalenone and soya have seen districts oedematous endometrium. In all groups we observed remnants of fetal packaging, suggesting embryonic mortality. With regard to the different level of decomposition, however, was not possible to determine the exact number of dead embryos. To estimate the degree of embryonic mortality was determined by the difference of both corpus luteum and piglets, and proportion of piglets and corpus luteum. While the first indicator was significantly higher in groups treated with Zea, in the second, we found only a statistically inconclusive trend.

Differences in the parameters "number of piglets' weight piglets", "the average weight of piglet", "uterine weight, fetal and packaging water" were statistically inconclusive. For most, however, show a tendency towards the highest values in the Zea + soya and conversely the lowest in the group Zea + meal.

It seems that used very low dose of zearalenone worked on some reproductive parameters of performance of gilts rather stimulating. At the same time, we observed a tendency for the opposite effect of compound feed soya the compound feed with fish meal. This is consistent with the findings of dual-action series xenoestrogens depending on the dose and hormonal profile sows.

Keywords: estrogen effects, sows, zearalenone, low-dose of zearalenone.

OBSAH

1	Úvod	- 1 -
2	Cíl práce	- 1 -
3	Literární rešerše	- 2 -
3.1	Zearalenon – mykotoxin s estrogenními účinky	- 2 -
3.2	Charakteristika a výskyt zearalenonu	- 2 -
3.3	Biotransformace zearalenonu	- 4 -
3.4	Absorpce, distribuce a exkrece zearalenonu	- 6 -
3.5	Biologické účinky zearalenonu	- 8 -
3.5.1	Účinky zearalenonu na reprodukční funkce prasat	- 11 -
3.5.1.1	Hyperestrogenismus	- 11 -
3.5.1.2	Efekt na pohlavní dozrávání prasniček	- 13 -
3.5.1.3	Ovlivnění pohlavního cyklu	- 13 -
3.5.1.4	Laktující prasnice	- 14 -
3.5.1.5	Vliv na plodnost	- 15 -
4	Metodika a materiály	- 17 -
4.1	Aplikace zearalenonu a genisteinu.	- 17 -
4.2	Klinický stav.	- 17 -
4.3	Detekce říje.	- 18 -
4.4	Inseminace.	- 18 -
4.5	Ukončení experimentu.	- 18 -
4.6	Vyšetření post mortem.	- 18 -
4.7	Statistické metody a sledované parametry	- 18 -
5	Výsledky	- 19 -
5.1	Březost	- 19 -
5.2	Úspěšnost inseminace	- 20 -
5.3	Počet žlutých tělísek	- 22 -
5.4	Hmotnost vaječníků	- 23 -
5.5	Hmotnost dělohy – intaktní a prázdné bez selat	- 24 -
5.6	Hmotnost plodových obalů	- 26 -
5.7	Hmotnost plodových vod	- 26 -
5.8	Počet selat	- 27 -
5.9	Embryonální mortalita	- 29 -
5.10	Hmotnost selat	- 30 -
5.11	Průměrná hmotnost selete	- 32 -
6	Diskuze	- 33 -
7	Závěry a doporučení	- 36 -
8	Seznam použité literatury	- 38 -

1 Úvod

Hospodářská zvířata jsou ovlivňována z prostředí látkami s estrogenními účinky, a to nejčastěji potravním řetězcem. Možným zaplísněním krmiva se do organismu dostávají látky, které mohou svou přítomností a svou činností způsobovat velké potíže v produkci a reprodukci zvířat.

Při sklizni a skladování se mohou krmné dávky intoxikovat zearalenonem a jeho metabolity. Zearalenon svou podobností estradiolu působí velké reprodukční, a tedy i ekonomické ztráty v chovech prasat. Při zkrmování nízkých dávek zearalenonu se v chovech objevují chronické mykotoxikózy s častým skrytým průběhem bez zřetelných klinických příznaků.

Nejvíce citlivými hospodářskými zvířaty jsou prasata, nejčastěji prasničky před dosažením puberty, také díky své krmné dávce, sestávající ze sójových komponentů a obilovin.

Účinky zearalenonu jsou dnes víceméně prostudované, ale výzkum byl více zaměřen na efekt vyšších dávek zearalenonu než na jeho účinek v nízkých dávkách.

2 Cíl práce

Cílem práce bylo experimentálně ověřit vliv nízkých dávek zearalenonu na zabřezávání prasniček a na ranný vývoj konceptů.

3 Literární rešerše

3.1 *Zearalenon – mykotoxin s estrogenními účinky*

Mykotoxiny jsou metabolity některých plísní vytvářejících vláknité povlaky na povrchu různých substrátů. Rostou na rostlinách, krmivech a potravinách, rozmnožují se rozrůstáním hyf nebo sporami a vykazují specifické biologické účinky na vyšší organismy. K jejich produkci dochází pouze za určitých podmínek, daných druhem plísně, substrátem, vlhkostí a teplotou prostředí. Metabolity plísní pronikají do substrátu, tím kontaminují potravní řetězce a stávají se významným zdrojem alimentárních intoxikací zvířat a člověka (Kalač a Míka, 1997, Cavret *et al.*, 2006).

Mykotoxiny jsou toxické látky nebilkovinné povahy, produkované patogenními plísněmi, z nichž k nejvýznamnějším patří rody *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria* a *Claviceps* (Osweiler, 2000).

Různé kmeny téhož druhu mohou produkovat více než jeden typ mykotoxinu a naopak řada rozličných plísní produkuje jeden typ mykotoxinu. V našich podmínkách je nejvíce rozšířen zearalenon, dále pak deoxynivalenol, ochratoxiny a T - 2 toxin (Kummer *et al.*, 2001, Kalač a Míka, 1997).

Z hlediska estrogenních efektů má ojedinělý význam rod *Fusarium* (*Giberella spp.*) (Betina, 1990), produkující tzv. trichoteceny, které dělíme do dvou skupin. V první jsou zahrnuty neestrogenní trichoteceny, např. deoxynivalenol (DON), nivalenol, T-2 toxin a diacetoxyscripenol. Deoxynivalenol je přítomen při mnoha mykotoxikózách u hospodářských zvířat společně se zearalenonem, zejména u prasat. Druhou skupinu představují nesteroidní estrogenní mykotoxiny zahrnující zearalenon (Zea) a jeho deriváty.

Zearalenon je nejlépe označován jako nesteroidní estrogen nebo mykoestrogen (Bennett a Klich, 2003).

3.2 *Charakteristika a výskyt zearalenonu*

Z fyzikálního hlediska se jedná se o bílou krystalickou sloučeninu, přičemž bod rozpustnosti se pohybuje mezi 164 – 165 °C. Maximální absorpce UV záření dosahuje 236 nm. Zearalenon je nerozpustný ve vodě, avšak rozpouští se v adekvátních organických a alkalických rozpouštědlech. Jedná se o sloučeninu, která během uskladnění, mletí, sterilace a vaření zůstává stabilní a nepodléhá ani degradaci při vysokých teplotách (EFSA, 2004).

Po chemické stránce je zearalenon charakterizován jako fenolický resorcinocyklický kyselý lakton, přičemž patří k nejvýznamnějším zástupcům fusariových toxinů (Mueller, 2002, Polak *et al.*, 2004, Kalač a Míka, 1997). Obvykle ho produkují plísňe *Fusarium graminearum*, *F. culmorum*, *F. roseum*, *F. tricinctum*, *F. oxysporum*, *F. moniliforme* a *Gibberella zeae* a další (Kummer *et al.*, 2001).

Rozšíření zearalenonu je celosvětové, nejčastěji kontaminovanými krmnými surovinami u nás jsou kukuřice, pšenice, žito, ječmen, čirok a oves. V sóje se může zearalenon taktéž vyskytovat.

Studie na pšenici a kukuřici inokulované na poli *Fusarium graminearum* vypovídají, že kukuřice byla kontaminována povětšinou oběma toxiny, zearalenonem i deoxynivalenolem, zatímco pšenice vykazovala vysoké hladiny deoxynivalenolu a obvykle malé množství nebo žádný zearalenon (EFSA, 2004).

Důležitým faktorem pro růst plísní je vlhkost prostředí a teplotní optimum. Skladištní plísňe bývají schopny růstu při vlhkosti 13 – 18 %, zatímco polní plísňe vyžadují obsah vody alespoň 20 – 25 %. Teplotní optimum většiny plísní se nachází v rozmezí teplot 25 – 30 °C. Nejodolnějším rodem je v tomto ohledu r. *Fusarium*, ze kterého si většina druhů zachovává svůj růst a biologickou aktivitu při teplotě nad 5 °C (Jesenská, 1987).

Koncentrace zearalenonu v potravě a krmivu nejvíce ovlivňují především klimatické podmínky. Houby produkující fusariové toxiny jsou dobře přizpůsobeny podnebí mírného pásma, růst podporuje vlhké období na podzim s nočními mrazíky, střídané pěkným počasím (Kalač a Míka, 1997). Názory jednotlivých autorů se dosti rozcházejí. Některé práce udávají, že zearalenon se vyskytuje v rostlinách spíše před sklizní (polní plíseň), než při uskladnění a téměř vždy je přítomen společně s ostatními fusariovými toxiny (EFSA, 2004). Jiné práce udávají, že zearalenon se nejvíce tvoří během uskladnění při teplotě 25 °C a 45 % vlhkosti, nízké dávky též při růstu (Cheeke, 1998). Zvýšení koncentrace zearalenonu se vyskytuje při vlhkosti 22 - 25 % nebo při opožděné sklizni. Jiné práce však uvádějí, že mykotoxin se tvoří při teplotě 3 - 8°C, při 25 °C k jeho tvorbě nedochází (Abbas *et al.*, 1989).

Ze studií ve Velké Británii vyplývá, že výskyt zearalenonu v travní senáži je pravděpodobně o mnoho menší než v kukuřičné siláži. Mirocha *et al.* (1968) zabývající se neplodností skotu v Anglii zjišťuje, že seno, kterým jsou zvířata krmena obsahuje zearalenon v koncentraci 14 ppm. Drochner *et al.* (1984) našel zearalenon v několika vzorcích sena v Německu. Naproti tomu podle výzkumů Benhama (1981) se zearalenon ve Velké Británii vyskytoval pouze v jednom ze 74 vzorků sena.

V krmivech živočišného původu (zvláště masové a rybí moučky) bývá zearalenon nejčastějším mykotoxinem (Cavret *et al.*, 2006, Kalač a Míka, 1997). Dále byl izolován z chleba, a je zaznamenán i přenos toxinu z kontaminovaného obilí do piva. Nejvyšší hladiny zearalenonu v pivě

byly nalezeny v Africe (2 – 50 mg/l), naopak v Kanadě, Evropě a Koree nebývá koncentrace zearalenonu a jeho derivátů vyšší jak 100 ug/l (Shim *et al.*, 1997; Scott, 1996). Jimenez *et al.* (1997) izolovali zearalenon dokonce i z banánu.

Zearalenon a jeho deriváty jsou stabilní toxické látky, způsobující mykotoxikózy a působící svým často skrytým průběhem problémy v reprodukci (Miller a Trenholm, 1994, Ranzenigo *et al.*, 2008). Vzhledem k tomu, že mykotoxiny jsou mimořádně stabilní organické látky a jejich toxicita nebývá běžnou úpravou krmiv podstatně snížena, mohou se už při relativně slabém zaplísnění substrátu tvořit dostatečná množství mykotoxinu pro vyvolání poruch zdravotního stavu zvířat. Rozhodujícími faktory pro celkový toxický účinek mykotoxinů, tak jak je známo z obecné toxikologie, je dávka a délka doby působení. Podstatnou roli sehrává věk, pohlaví a druh exponovaných živočichů. Kombinace dvou či více mykotoxinů vyskytujících se v krmivu současně, což není neobvyklé, může působit toxicitěji než jednotlivé mykotoxiny v důsledku jejich synergismu. Mykotoxiny vyvolávají onemocnění nazývané mykotoxikózy, které se mohou vyskytovat v akutní nebo chronické podobě. Akutní mykotoxikózy, vyskytující se velmi zřídka, vznikají po požití vyšších dávek mykotoxinu, což způsobuje specifický a klinicky zjevný akutní syndrom onemocnění nebo smrt. Chronické mykotoxikózy, vyskytující se v chovech velmi často, vznikají při opakovaném nebo dlouhodobém příjmu středních a nízkých množství toxinů. Problémem bývá jejich většinou subklinický průběh, čímž vesměs unikají pozornosti. Skrytý průběh bez zřetelných klinických příznaků onemocnění může být vážným problémem chronické mykotoxikózy, kdy příčiny snížené produkce a reprodukce zvířat jsou často hledány v řadě jiných oblastí (virové infekce, skladba krmných dávek, karence minerálních prvků a vitamínů apod.) (Cavret *et al.*, 2006, Kalač a Míka, 1997, Kummer *et al.*, 2001).

Nejvíce citlivými zvířaty jsou prasata, hlavně prasníčky před dosažením puberty, také díky složení jejich krmné dávky (Kalač a Míka, 1997, Kummer *et al.*, 2001).

3.3 Biotransformace zearalenonu

Biotransformace zearalenonu probíhá především v játrech. Jeho hlavními metabolity jsou α - a β - zearalenol a jejich glukuronované konjugáty. Dále mezi deriváty zearalenonu patří 3 - hydroxyzearalenon, 8' - hydroxyzearalenon a 5 - formylzearalenon (Hagler *et al.*, 1979). Poměr mezi oběma izomery se u různých živočichů liší. Například u lidí a prasat je nalézán vysoký podíl α - derivátu. α - a β - zearalenol jsou schopny dále oxidovat za vzniku dalších derivátů, mezi které patří α - zearalanol (zearanol) a β - zearalanol (taleranol). Obě tyto sloučeniny pak dále podléhají redukci za vzniku jiného velmi důležitého metabolitu, kterým je zearalanon (obr.1). Existuje hypotéza, že může dojít k přeměně zearalanonu zpět na α - a β - deriváty. Bories *et al.* (1991) ve své další publikaci uvádí, že dochází pouze k tvorbě monokonjugátů, přičemž ke konjugaci dochází

na aromatickém kruhu. Zearanol, taleranol a zearalanon, stejně jako zearalenon, podléhají konjugaci s kyselinou glukuronovou a sírovou za vzniku jejich glukuro- a sulfo- konjugátů. Ve schopnosti glukuronizace však existují mezidruhové rozdíly (EFSA, 2004, Polak *et al.*, 2004, Obremski *et al.*, 2003).

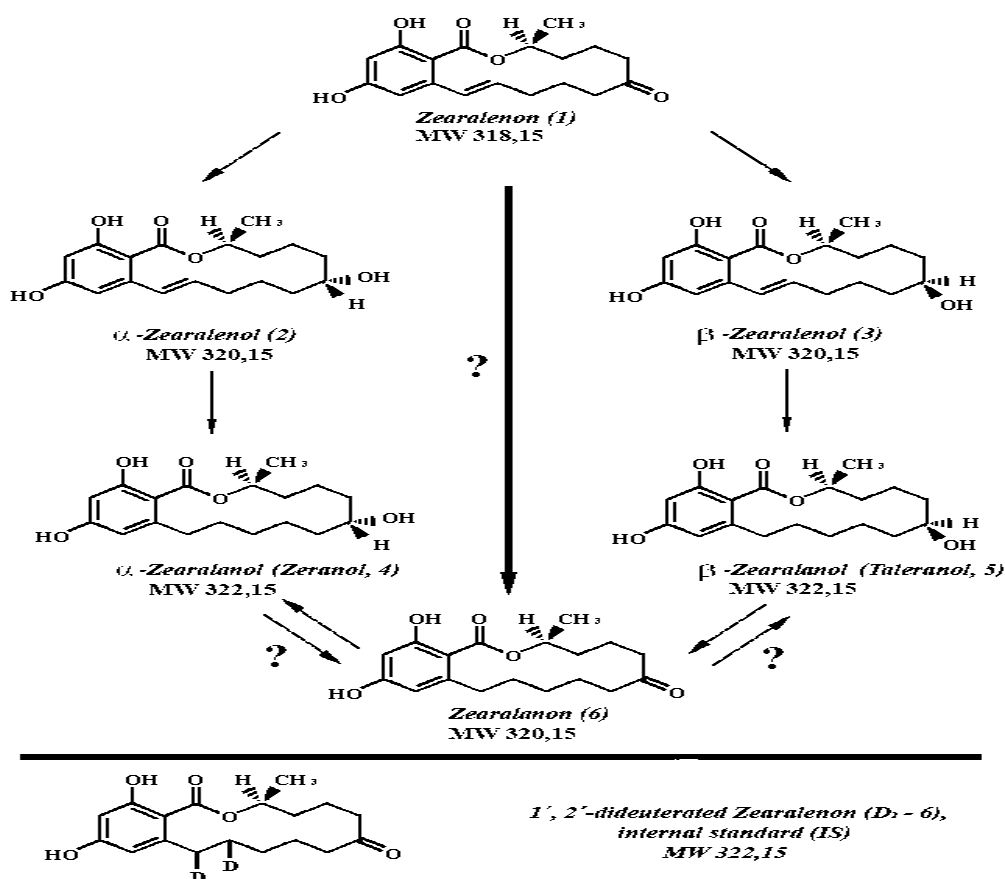
Studie *in vitro* ukazují, že bovinní jaterní mikrosomy jsou též schopny oxidovat zearanol na zearalanon (Bories a Suarez, 1989).

Je zdokumentováno, že deriváty zearalenonu mají třikrát až čtyřikrát vyšší účinnost než zearalenon sám. Toto tvrzení podporuje Fitzpatrick *et al.* (1989), který popisuje, že α - zearalenol vykazuje nejvyšší afinitu k estrogenovým receptorům ve srovnání s zearalenonem a s jeho β derivátem, který ji má nejnižší.

Signifikantní rozdíly mezi druhy byly zjištěny v metabolickém profilu moči a výkalů. U prasat se zearalenon zmetabolizoval na α - zearalenol více než u krys a krav. U lidí a prasat je v moči převážně detekován jako glukuronovaný konjugát nebo α - zearalenol.

Analýza moče prasat ukázala, že 60 % Zea je *in vivo* přeměněno na α - zearalenol a β - zearalenol v poměru 3:1. A dále Olsen *et al.* (1985) ve své práci popisují, že po denním zkrmování zearalenonu v dávce 192 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ž.h. po 4 dny byla koncentrace α - zearalenolu v plazmě 3 – 4krát vyšší než koncentrace zearalenonu. Maximální hladiny zearalenonu a α - zearalenolu (10,4 ng/ml) byly detekovány čtvrtý den podávání. Do moče se vyloučilo 305 ng/ml. Zearalenone a α - zearalenol jsou v plazmě i v moči zcela konjugovány s kyselinou glukuronovou. V jiném experimentu (Benham, 1981), kde byla prasata krmena potravou kontaminovanou 80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ž.hm. byl zearalenon a α - zearalenolu téměř všechen nalezen v glukurované formě v plazmě i moči, pouze 10 % je nalezeno ve volné formě.

Dispozice a metabolismus zearanolu po *per* orálním podávání byl studován také u krys, králíků, opic a člověka. U prasat byl zearanol podáván také formou implantátu (Bories a Suarez, 1989). U všech těchto živočišných druhů se hlavní fáze biotransformace zearanolu sestávala z oxidace OH skupiny na C - 7 na odpovídající keton zearalanone. Kromě toho byl jako výsledek redukce zearalanonu působením aldoketoreduktázy identifikován diastereoisomer β - zearalanol, nebo taleranol v moči králíka a v plazmě prasat (Bories a Suarez, 1989).



Obrázek č.1.:

Zearalenon a jeho hlavní metabolity *in vivo* u prasat

(konjugované formy nejsou znázorněny)

3.4 Absorpce, distribuce a exkrece zearalenonu

Zearalenon bývá v organismu vyšších živočichů poměrně dobře absorbován. Po orální administraci dochází k jeho velmi rychlému vstřebání do organismu. Biehl *et al.* (1993) odhaduje, že intestinální absorpce po příjmu 10 mg/kg hmotnosti dosahuje 80 – 85 %. Nejčastější je detekován v moči a žluči zvířat (Danicke *et al.*, 2005).

Po vstřebání v tenkém střevě se zearalenon dostává do krevního oběhu a jater, kde dochází k jeho velmi rychlé metabolizaci a glukuronizaci. Velká část se vylučuje žlučí do střeva a enterohepatálním oběhem se zpět reabsorbuje v distálnějších partiích tenkého střeva. Lze tedy usuzovat, že enterohepatální oběh je vlastně odpovědný za intenzitu působení zearalenonu (Biehl *et al.*, 1993).

Rychlost absorpce a metabolismu byla dokumentována daty různých autorů. Studie na krysách potvrzují, že 20 minut po orálním podání zearalenonu je nacházeno ve střevě pouze reziduální množství toxinu (4,5 %). Olsen *et al.* (1987) popisuje, že po perorálním příjmu zearalenonu docházelo u prasat k jeho metabolizaci prostřednictvím střevní mikroflóry na metabolity, přičemž převládajícím metabolitem je jeho β - isomer. Studie s radioaktivně značeným zearalenonem u myši prokázaly, že dochází k jeho distribuci do estrogen-receptivních tkání jako jsou uterus, intersticiální buňky varlat a ovariální folikuly. Určité množství radioaktivně značeného zearalenonu bylo také nalezeno v tukové tkáni. To dokazuje, že mimo jiné dochází taktéž k ukládání zearalenonu do tkáně tukové.

Po absorpci se zearalenon a jeho metabolity velmi rychle dostávají do krve, v plazmě prasat byly nalezeny dříve jak za 30 minut od podání toxinu. Převažoval zearalenon a α - zearalenol. Největší část přijatého množství toxinu byla u prasat vylučována během 72 hodin (Zwierzchowski *et al.*, 2006).

K vylučování zearalenonu a jeho metabolitů u většiny druhů zvířat dochází především žlučí. U králíka a muže převládá exkrece zearalenonu (zejména konjugátů) močí. U ostatních zvířat dochází k tomu, že vylučuje 70 – 80 % výkaly (Hidy *et al.*, 1977, Mirocha *et al.*, 1981). Edwards *et al.* (1987a) ve své studii popisuje, že při zkrmování 10 ppm zearalenonu se výkaly vylučuje po dobu 8 dnů. Fitzpatrick *et al.* (1989) nezjistili žádný vliv dávky na cestu exkrece zearalenonu u krys po orálním podání 1mg nebo 100 mg/kg ž.hm..

Studie na krysách potvrdily, že 20 minut po orálním podání zearalenonu je nacházeno ve střevě pouze reziduální množství toxinu (4,5 %) (Ramos *et al.*, 1996).

Určité množství radioaktivně značeného zearalenonu bylo také nalezeno v tukové tkáni. To dokazuje, že mimo jiné dochází taktéž k ukládání zearalenonu do tkáně tukové (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

Biologický poločas rozpadu radioaktivního zearalenonu u pohlavně nevyzrálých prasniček po podání 5 mg/kg ž.hm. intravenózně nebo 10 mg/kg ž.hm. per orálně je odhadována na 87 hodin. Při odebrání žluče klesl biologický poločas na 3,3 hodiny, což ukazuje na roli enterohepatálního oběhu u prasat. Prasatům, kterým se odebrala žluč, bylo nalezeno 46 % radioaktivního zearalenonu. Ve výkalech bylo přítomno pouze 6,6 % u prasat po per orální aplikaci a 22 % po intravenózní. Po orální administraci, 45 % přijatého množství se dostává do moče, 22 % do fécés, a celkové akumulované množství v moči a fécés po 48 hodinách bylo 67 %.

Játra v hlavní míře obsahují α -zearalenol, minimálně β - zearalenol (2,5:1) a zearalenon. Stupeň glukuronizace pro zearalenon v moči a játrech byl 27 % a 62 %. Pro α - zearalenol vykazoval 88 % a 77 % a β - zearalenol 94 % a 29 %.

Svaly obsahovaly velké množství neglukuronovaného zearanolu, α - zearalenolu společně s taleranolem a zearalenonem, což dokazuje, že zearalenon a jeho metabolity nejsou omezeny pouze na hepatalní a gastrointestinální cestu (Zöllner, 2002).

3.5 *Biologické účinky zearalenonu*

Působení závisí jak na samotném druhu toxinu, tak na přijatém množství toxinu, délce zkrmování, individualitě zvířete, pohlaví, plemeni a výživovém stavu (Kalač a Míka, 1997). Tyto látky s nápadně odlišnou chemickou strukturou od přirozených hormonů mohou vyvolávat stejné fyziologické odezvy jako přirozené hormony. Přirozené steroidní hormony obecně (obvykle) působí prostřednictvím vazby na specifické receptorové místo, ale environmentální estrogény mohou ovlivňovat hormonální systém i mnoha jinými cestami (např. inhibicí kináz), když je sloučenina vázána na receptor mohou:

- ✓ vyvolat normální fyziologickou odezvu
- ✓ způsobit abnormální odezvu nebo nevyvolat žádnou odpověď zablokováním receptorového místa a zabránit přirozeným hormonům navázání na receptor
- ✓ vázat se na jiný receptor a vyvolat novou reakci nebo nepřímo narušovat normální hormonální reakci
- ✓ měnit tvorbu a rozpad hormonálního receptoru a přirozených hormonů modifikací endokrinní odpovědi (Tapiero *et al.*, 2002).

Zearalenon a zearalenol mohou vyvolat atrofii brzlíku a aktivaci makrofágů. Zearalenon a jeho analogy jsou schopné inhibovat mitogeny stimulované proliferace lymfocytů (Forsell a Pestka, 1985). Podávání 10 ppm zearalenonu v dietě po dva týdny vedlo ke snížení odolnosti k *Listeria monocytogenes*, ale nemělo žádné účinky na titry protilátek nebo pozdější typické hypersenzitivní reakce.

Zearalenon a jeho metabolity mají estrogení, antiestrogení, antiandrogení a anabolické účinky. Dále mají cytotoxické, neurotoxické, imunotoxické účinky, podobně jako teratogení, mutagení a karcinogení účinky (Kummer *et al.*, 2001, Obremski *et al.*, 2008). U jednotlivých derivátů jsou tyto efekty zastoupeny různou měrou.

Mezinárodní agentura pro výzkum rakoviny (IARC) zařazuje zearalenon do kategorie „omezeně karcinogenních látek“, registrován je také ve skupině látek s teratogenními účinky (Kalač a Míka, 1997). „Risk assessment“ (Hodnocení rizika = proces vyhodnocení pravděpodobnosti vzniku a závažnosti nežádoucích účinků vystavení člověka nebo životního prostředí zdroji rizika za definovaných podmínek, a to včetně zahrnutí možných průvodních nečekaných situací) pro zearalenon provedly EC Scientific Committee on Food, FAO/WHO Joint Expert Committee on

Food Additives a Nordic Sorking Group. Prozatímní přípustný denní příjem (t - TDI) je stanoven SCF na 0,2 µg/kg ž.hm., zatímco JECFA určuje za PMTDI (denní maximální toleranční dávku) 0,5 µg/kg ž.hm. (EFSA, 2004).

Zearalenon je bez pochyby příčinou problémů s užitkovostí u hospodářských zvířat, přičemž nejvíce ovlivňovanými hospodářskými zvířaty jsou prepubertální prasnice díky složení krmné dávky (Osweiler, 2000). Dopady mykotoxinu zearalenonu na reprodukční funkce jsou spíše negativní. Zearalenon ovlivňuje reprodukční orgány domácích zvířat - ovlivňuje růst, vývoj a funkce důležitých orgánů. Způsobuje deformace, dysfunkce a edémy pohlavního traktu.

Estrogenní účinky jsou nejdůležitější vlastností zearalenonu a jejich podstata je dobře prozkoumána. Příčinou je blízká strukturální podobnost mezi Zea (a množstvím jeho metabolitů) a steroidním estrogenním hormonem estradiolem. Zearalenon obsahuje hydroxylové skupiny (ligandy), které se snadněji vážou na estrogenové receptory než normální estrogény (Osweiler, 2000).

Pro člověka může být zdrojem toxinu mléko, do kterého se zearalenon vylučuje asi 0,01 % přijaté denní dávky. V odborné literatuře existují práce popisující korelaci mezi výskytem zearalenonu a dalších trichothecenů v potravě matek v průběhu těhotenství a výskytem některých poruch nervového systému u potomstva, včetně schizofrenie. Odhaduje se, že pro člověka je bezpečný příjem ZEN do výše 0,05 µg/kg tělesné hmotnosti (Kummer *et al.*, 2001).

U ovcí v menší míře také docházelo k přenosu zearalenonu do mléka (Radostis *et al.*, 1997). Zhoršení fertility ovcí na Novém Zélandu působením zearalenonu ve spásaných porostech popisují Di Menna *et al.* (1991) a Smith *et al.* (1990). Zearalenon mohl rovněž vyvolávat „estrogenní syndrom“ zahrnující aborty, mírné vulvovaginitidy a hypertrofii dělohy.

Zearalenon a jeho deriváty se používají v USA jako anabolické preparáty, které podporují růst ovcí a hovězího dobytka (Demain, 1983). V USA byl schválen jako implantát do podkoží ucha u masného skotu a ovcí v dávce 36 mg a 12 mg, protože zvyšoval rychlost přírůstku a zlepšoval konverzi krmiva (Bories a Suarez, 1989).

U skotu i přes určitou odolnost přežvýkavců vůči zearalenonu byly pod jeho vlivem pozorovány u dojnic poruchy plodnosti, zvýšení výskytu onemocnění mléčné žlázy (zvýšený počet somatických buněk v mléce), paznehtů a zhoršení vitality narozených telat. Podobně jako u ostatních hospodářských zvířat byla popsána vulvovaginitida, nepravidelné říje a snížená fertilita vyvolaná působením zearalenonu. Za kritické koncentrace v krmné dávce pro dojnice (limit i pro ostatní zvířata) se považuje 0,5 mg/kg krmiva (88 % sušiny). U prepubertálních jalovic mléčných plemen bylo při zkrmování zaplísněného obilí zaznamenáno zvětšení mléčné žlázy. Celkové účinky jsou však slabší než u prasat (Kummer *et al.*, 2001).

Analýza krmných směsí pro králíky ukázala, že 63 % vyšetřovaných vzorků je pozitivních na zearalenon. Krmení krmivem obsahujícím zearalenon vyvolává poruchy reprodukce také v některých chovech králíků (Migdalof B. H., 1983)

Wentworth *et al.* (1979) uvádějí, že výsledky jednotlivých experimentů s 10, 100, 1000 ppm ZEA u rostoucích krůt a kachen jsou značně nestandardní, často se u krůt do 4 týdnů projevují lepší přírůstky a u samců konverze živin. U kachen se podobný efekt neprojevuje. Podíl vody ani tuku v těle není ovlivněn. U obou druhů je patrná neobvyklá krotkost nebo zklidnění, mladí krocani se projevují jako krocani dospělí. Vysoce významný je nárůst hmotnosti vejcovodu u krůt i kachen a pokles hmotnosti vaječníků, resp. varlat u krůt.

Kummer *et al.* (2001), Allen *et al.* (1981), Marks a Bacon (1976) a Speers *et al.* (1971) vesměs dospěli k závěru, že u starších kuřic a kohoutů ZEA neovlivnil jejich reprodukční výkonnost. Ve studii ani 800 ppm ZEA podávaného 3 týdny neovlivnilo hmotnost hřebínků a vejcovodů 6 – 9 týdenních kuřiček, hmotnost varlat a vaječníků 3,5 – 6,5 týdenních krůt, ani žádné histologické nálezy. 400 ppm a 800 ppm ZEA u kohoutků redukovalo hmotnost hřebínků a varlat. U malých krocánů pak byl nápadný rozvoj laloků a výběžků a nástup vyzývavého chování.

U plemených krocánů, docházelo k oligospermii, aspermii a k morfologických změnám spermií. Taktéž Vanyi *et al.* (1994) a Marks a Bacon (1976) zjistili po 2 - 3 týdnech zkrmování 30 ppm ZEA (kontaminované zrno) zánik spermiogeneze u perliček. Další práce popisovala poruchu spermiogeneze houserů zkrmováním kukuřice obsahující zearalenon (Kalač a Míka, 1997). Na brojlerová kuřata měla i vyšší množství zearalenonu v krmivu jen malý vliv.

Maryamma *et al.* (1992) nalezájí po dávce ZEA 10 mg/kg ž.hm. u 5 týdenních kuřat, atrofii semenotvorných kanálků, proliferaci vmezežené tkáně ve varlatech a občas cystické prostory ve Fabriciově burze.

Údaje o účincích ZEA na organismus drůbeže nejsou zcela jednoznačné. U nosnic může zearalenon způsobit viditelné změny na vejcovodech s následným snížením produkce vajec, avšak práce jednotlivých autorů se v mnoha případech neshodují.

Maryamma *et al.* (1992) pozorovali u 3 týdenních kuřat po 7 dnech intoxikace zvětšení hmotnosti vejcovodu úměrně dávce ZEA, statisticky významné od 400 ppm ZEA v dietě. Zkrmování 100 ppm zearalenonu husám po dobu 42 dnů nevedlo k významnému klinickému ani *post mortem* nálezu, pokles snášky ani fertility nebyl signifikantní (Palyusik *et* Koplík-Kovacs, 1975). U krůt ve snůšce 100 ppm ZEA zkrmovaného po dobu 8 týdnů vyvolalo mírný pokles snášky (někdy i významný), odezva na vakcinaci, oplozenost vajec, líhivost ani embryonální mortalita zůstaly neovlivněny. Dříve pozorované efekty kontaminace krmiva kmeny *Fusarii* nebylo možno vysvětlit účinky čistého ZEA.

Byly získány důkazy o jeho embryopatických účincích na potkany a předpokládá se, že má podíl v etiologii nádorů. Hodnoty LD₅₀ pro různá zvířata jsou velmi vysoké (2 – 10 g/kg) (Kalač a Míka, 1997). Dále má zearalenon slabé antibakteriální účinky na grampozitivní sporotvorné druhy (Boutibonnes, 1979).

Naproti tomu Whitten a Naftolin (1992), Whitten *et al.* (1992) a Sharpe a Skakkeback (1993) uvádějí, že vystavení samců hlodavců estrogením látkám v průběhu nitroděložního vývoje může mít na reprodukční funkce nepříznivé účinky – např. narušení kvality spermatu, zvýšení výskytu vrozených malformací (kryptorchismus) a rakoviny varlat. U potkana byly pod vlivem zearalenonu pozorovány léze uteru, testes a dalších orgánů při dávkách 10 – 100 mg/kg živé hmotnosti (nezkrmovat více jak 500 µg/kg) (Kalač a Míka, 1997).

Studie s radioaktivně značeným zearalenonem u myši prokázaly, že dochází k jeho distribuci do estrogen-receptivních tkání jako jsou uterus, intersticiální buňky varlat a ovariální folikuly (Kuiper-Goodman *et al.*, 1987).

3.5.1 Účinky zearalenonu na reprodukční funkce prasat

V prvních studiích byla pohlavně nevyspělá prasata krmena dietou kontaminovanou F - 2 toxinem. Publikace popisují příznaky hyperestrogenismu charakterizované zvětšením mléčné žlázy, zarudnutím a edematickým 3 až 4 násobným zvětšením vulvy, otokem a prolapsem vaginy u prasniček (až u 30 %). Dochází ke zvětšení velikosti a hmotnosti ovárií a v pozdější fázi až k atrofii ovárií. Objevují se uterotrofní účinky, uterus je zvětšen, neboť dochází k proliferaci sliznice a svaloviny. Častá ztráta reflexu nehybnosti (Nešić *et al.*, 2008). U sajících selat díky intoxikaci mateřského mléka vysokými koncentracemi zearalenonu se zvětšují vulvy. U kanců se vyskytuje zakrnění varlat a rektální prolaps a prodloužení bradavky mléčné žlázy (Kummer *et al.*, 2001, Zwierzchowski *et al.*, 2006; Danicke *et al.*, 2005, Kalač a Míka, 1997, Radostis *et al.*, 1997). Kanci mají spermie se sníženou životaschopností a motilitou, se zvýšenou apoptózou a změněnou reakcí akrozómu (Benzoni *et al.*, 2008).

3.5.1.1 Hyperestrogenismus

K estrogenizaci prasniček a prasnic docházelo především v zimě a časně z jara, protože plíseň, kterou bylo napadeno zrno, potřebovala období relativně nízkých teplot, aby mohla produkovat biologicky významná množství zearalenonu. Příznaky intoxikace se objevily do 3 až 6 dnů od začátku příjmu toxinu a po přerušení zkrmování brzy vymizely (Osweiler, 2000).

Hyperestrogenismus byl patrný u nedospělých prasniček krmných přirozeně kontaminovanou dietou nebo krmivem s přidavkem krystalického zearalenonu dokonce i při relativně nízké dávce (1,5 – 2 ppm). Projevy hyperestrogenismu se mohly vyvíjet od 4. do 7. dne po konzumaci kontaminované potravy a mizely během 3 - 4 týdnů po skončení jejího příjmu. Avšak nedocházelo k projevům obvyklého estru (vymizení říje nebo déletrvající říje, častá pseudogravidita), byla poškozena plodnost, snížena fertilita a zralost oocytů, zvýšena aneuploidie blastomer u embryí a způsoben abnormální fetální vývoj plodů (Alm *et al.*, 2006; Malekinejad *et al.*, 2007; Tiemann *et al.*, 2007, Radostis *et al.*, 1997). Docházelo k rané embryonální mortalitě, k malformaci plodů, objevily se menší vrhy se sníženou hmotností selat a následnými brzkými neonatálními mortalitami (Osweiler, 2000). Syntéza proteinů, humorální a buněčná odpověď reagovaly na dávku a dobu působení - jako inhibování proliferace buněk uteru a změna procesu translace se změněnou estrogenní aktivitou (Tiemann *et al.*, 2006; Tiemann *et al.*, 2007).

Klinické příznaky zahrnovaly hyperémii, edematická rodidla s kalným vaginálním výtokem, zvětšené mléčné žlázy, hypertrofii prsních bradavek a v těžkých případech vaginální a rektální prolaps. Následovala infertilita, popř. abortus (Kalač a Míka, 1997).

I když intoxikace zearalenonem není fatální, docházelo obvykle k úhynu zvířat z důvodů bakteriální infekce vyhřeznutých orgánů (sekundární cystitidy, urémie a septicémie).

Uterus byl výrazně zvětšen, neboť docházelo k proliferaci sliznice a svaloviny. V pozdější fázi se většinou vyvinula atrofie ovarií se sníženou kvalitou oocytů (Alm *et al.*, 2006).

Při histologickém zpracování zde byly pozorovány výrazné změny spojené s poruchou reprodukce. Častým nálezem bylo zesílení sliznice vaginálního epitelu (Young a King, 1981). Mikroskopické změny zahrnovaly edém a ztlustění (zesílení) uteru způsobené kombinací hypertrofie a hyperplazie endometria a myometria.

Kurtz *et al.* (1969) pozorují stejné histologické změny u desetitýdenních prasniček, kterým je podáván estradiol, krystalický F - 2 toxin (25 mg denně) nebo zrno inokulované *Fusarium graminearum*. Na rozdíl od pohlavně nezralých prasniček, vnější projevy hyperestrogenismu nejsou popsány u cyklujících, březích nebo laktujících prasnic. Long *et al.* (1982) dospívají k závěru, že k vyvolání hyperestrogenismu u pohlavně vyspělých prasnic je zapotřebí o mnoho vyšší dávky než u prasniček pohlavně nedospělých. Příznaky hyperestrogenismu po přirozené kontaminaci krmiva se projevují až při dávce 64 ppm a to pouze u dvou ze čtyř prasnic (110 kg).

Ačkoli mnoho experimentů využilo přirozenou kontaminaci krmení, Kurtz *et al.* (1969) zjistili, že histologické změny vzniklé působením estradiol – 17 β - cyclopentyl propionátem, purifikovaným F - 2 extraktem nebo krmivem přirozeně kontaminovaným *Fusarium* jsou nerozpoznatelné.

Další práce Long *et al.* (1992) popisují experiment, při kterém dochází ke zkrmování 1 mg zearalenonu/kg ž.h. denně od 7. do 10. dne březosti. Je zjištěno, že podávaný zearalenon nemá žádný efekt na výšku endometriální sliznice v den 9. a 13. po připuštění a nemá žádný efekt na sekreční vesikuly v endometrálním žláznatém epitelu. Dávka použitá v této publikaci nezpůsobuje žádné morfologické změny v endometriu, které mohou být spojovány s hyperestrogenismem.

Při zkrmování vyšší dávky zearalenonu (10 ppm) po dobu čtrnácti dnů dochází už během třetího až pátého dne ke zřetelnému otoku vulvy, avšak není popisován reflex znehybnění. Zduření vulvy přetrvává po celou dobu příjmu toxinu a odeznívá během jednoho týdne po skončení příjmu kontaminovaného krmiva. To se shoduje s tvrzením Edwards *et al.* (1987b), kdy jsou prasata exponována stejnou dávkou po dobu 30 dnů.

3.5.1.2 Efekt na pohlavní dozrávání prasniček

Ačkoli celkové a histologické změny, které jsou vyvolané působením zearalenonu, jsou dobře popsány u prepubertálních prasniček, méně je známo o estrogenizaci zvířat v pubertě a následném ovlivnění reprodukce, jako ztlustěná vrstva cortex s vysokým počtem primárních folikulů a rostoucích ovariálních folikulů různých velikostí a postupná degenerace a atrofie ovárií při vyšších dávkách zearalenonu (Doboszynska *et al.*, 2005). Edwards *et al.* (1987b) zveřejňují, že prasničky ve věku 163 dnů krmené 10 ppm zearalenonu po dobu 30 dnů ukazují první estrus zhruba o deset dnů později než prasničky kterým není zearalenon podáván. U zvířat, která jsou chována v přítomnosti kance po dobu 60 dnů k oddálení prvního estru nedochází.

Naproti tomu prepubertální prasničky, které konzumují 1,8 ppm zearalenonu od 70. dne věku po dobu 45 nebo 90 dnů, dosahují puberty v mladším věku než u kontrolní skupiny, aniž dochází k alteraci ovulace, zabřezávání nebo embryonálnímu přežívání.

Tento rozpor může souviset s rozdílnými dávkami zearalenonu, věku prasnic a doby podávání toxinu.

3.5.1.3 Ovlivnění pohlavního cyklu

Zearalenon způsobuje mnoho poruch funkce reprodukčního systému u pohlavně dospělých, cyklujících prasniček (Rainey *et al.*, 1990). Chang *et al.* (1979) zveřejnili, že koncentrace 25 – 100 ppm zearalenonu podávaná od odstava selat nepřetržitě po celou dobu další březosti vyvolala kontinuální estrus, pseudograviditu a nakonec mohla vést i k neplodnosti zvířat. Flowers *et al.* (1987) prodloužili meziříjový interval podáváním buď 20 mg Zea nebo 2 mg estradiol benzoátu prasnicím 6. – 10. nebo 11. – 15. den estrálního cyklu.

Prodloužený cyklus byl taktéž popsán u prasnic, které byly vystaveny vlivu 5 – 10 ppm zearalenonu mezi 5. a 20. dnem říje. Interestrální interval se významně zvyšoval z 21 dnů na 29 a 33. Dávka 1 mg Zea neměla vliv na délku mezi říjivého období. Zvířata s prodlouženým cyklem vykazovala zvýšenou koncentraci progesteronu v plazmě, což mělo za následek perzistenci žlutých tělísek. Ke spontánní regresi docházelo po 30 dnech od odstranění zearalenonu z diety.

U 45 % prasnic krmených dietou obsahující 3,6 – 4,3 ppm zearalenonu od puberty až do připuštění nedocházelo k navrácení do normálního estru ani během padesáti dnů (Etienne a Jemmali, 1982). Anestrus byl potvrzen absencí corpora albigenia a nálezem corpora lutea. Kromě toho děložní rohy byly edematózní a po transverzální sekci nebylo patrně téměř žádné lumen. Váha dělohy byla téměř dvojnásobná oproti zvířatům, která nebyla ovlivněna toxinem. Podobný projev pseudogravidity popsali Young a King (1986) u pubertálních prasniček po konzumaci 6 – 9 ppm zearalenonu ode dne po první říji.

3.5.1.4 Laktující prasnice

Laktující prasnice jsou náchylné k působení zearalenonu. Prasnice krmené dávkou 50 - 100 ppm zearalenonu po dobu 14 dnů před a 63 dnů po odstavu vykazovaly kontinuální estrus. Toto dlouhodobé zkrmování vysokou dávkou zearalenonu vedlo až k atrofii vaječníků. Oddálení říje po porodu lze dosáhnout zkrmováním diety obsahující 10 ppm Zea během posledních 14 dnů laktace Edwards *et al.* (1987a) bez ovlivnění plodnosti. Podobně Young *et al.* (1982) popsali, že nižší dávky zearalenonu (2,1 – 4,8 ppm) podávaného během březosti a laktace plodnost po odstavu neovlivnily.

Několik dalších experimentů se zabývá efektem zearalenonu během laktace. Selata prasnic substituovaných 10 ppm Zea od 14 do 28. dne laktace nepodléhla jeho vlivu. Zkrmování Zea během březosti a laktace zvyšovala mortalitu selat prvních 14 dnů po narození. Váha selat ve 14. dnu věku nebyla narušena, ovšem uterus a vagina selat byl těžší při působení vyšší dávky ZEA (4,8 ppm). Otok vulvy je popsán u 21 dnů starých selat. Kojící prasnice byly suplementovány 40 ppm zearalenonu od 8. dne laktace. To svědčí o tom, že selata mohou být ovlivněna toxickým působením zearalenonu buď během intrauterinního vývoje nebo prostřednictvím mléka. Ovšem podle Young *et al.* (1982) v mléce ani ve fetální a placentární tkáni (Etienne a Jemmali, 1982) nebyly detekovány žádné metabolity zearalenonu. S tímto tvrzením se ne zcela shodují práce Palyusik *et al.* (1980), kteří detekují metabolity zearalenonu v některých vzorcích mléka prasnic krmených toxinem. Ačkoli tyto metabolity nebyly detekovány ve všech vzorcích, lze se domnívat, že jsou obsaženy ve velmi malých dávkách v mléku a mohou způsobit hyperestrogenismus u sajících mláďat.

3.5.1.5 Vliv na plodnost

Působením zearalenonu docházelo velmi významně k ovlivnění plodnosti prasnic. Stupeň postižení byl odvislý od různých faktorů, podstatnou roli hrála dávka zearalenonu, doba expozice a období vystavení účinku zearalenonu.

Při zkrmování zearalenonu mohlo docházet k ovlivnění počtu novorozených selat ve smyslu snížení počtu vrhu, dále nižší životaschopnost mláďat po narození, snížení hmotnosti selat atd. Bylo to zdokumentováno experimenty několika autorů:

Suplementací 10 ppm zearalenonu před pářením nedocházelo k ovlivnění koncepce, míry ovulace ani počtu mláďat, životaschopnosti selat a stupně embryonální mortality. Při podávání 9 ppm během březosti (Young a King, 1986; Etienne a Jemmali, 1982) nedocházelo k ovlivnění počtu novorozených selat. Ačkoli v mnoho dalších experimentech dochází ke snížení počtu selat ve vrhu nebo dokonce k odumření celého vrhu. Je to přisuzováno vystavení prasat abnormálně vysokým dávkám zearalenonu: 64 ppm 60 a 90 ppm (Long a Diekman, 1984) nebo 108 mg denně (Long a Diekman, 1986). Při vystavení nižším dávkám do 30 ppm (Long a Diekman, 1984) nedocházelo k významnému snížení počtu narozených selat.

Třebaže z výše uvedeného vyplývá na dávce závislý efekt, mnohé experimenty dokazují, že méně jak 60 ppm Zea má za následek narození menších selat a nižší životaschopnost mláďat. Etienne a Jemmali (1982) zjistili, že váha plodů v 80. dnu březosti byla snížena o 24 %. Young a King (1986a) publikovali, že prasničky krmené dietou obsahující více jak 3 ppm ZEA během březosti vykazují snižování váhy selat při narození se zvyšující se dávkou toxinu 1,42; 1,3; 1,21; a 1,05 kg při 0, 3, 6, a 9 ppm Zea. Naopak podle Long a Diekman (1986; 1984) není hmotnost plodů alterována při krmení prasnic dietou obsahující vysokou hladinu Zea. Ačkoliv kontaminované krmivo je podáváno během 4 – 13 dnů a 16 dnů před začátkem březosti.

Long *et al.* (1982) ukazují, že incidence málo početných vrhů (1 - 3 selat) stoupá se zvyšující se dávkou Zea od 0, 7, 38 do 64 ppm.

Důležitou roli hrála fáze březosti, kdy byla prasnice vystavena účinkům toxinu. Pokud byla prasnice ovlivněna zearalenonem během 7. – 10. dne březosti, docházelo k výrazné embryonální mortalitě, zatímco v případě krmení toxinu 2. - 6. nebo 11. - 15. den březosti nebyl popsán žádný negativní efekt (Long a Diekman, 1986). Toto tvrzení částečně doplňoval experiment Long *et al.* (1992), kteří zjistili, že suplementací 1 ppm Zea 7–10 den březosti nebyl embryonální vývoj ovlivněn 9. den po připuštění, v 11. dnu docházelo k částečné degeneraci embryí a v den 13. byly blastocyty v pokročilém stádiu degenerace.

V řadě prací se také projevuje embryonální mortalita. Rozlišení, zda jde o ranou embryonální odúmrtí nebo embryonální mortalitu způsobenou vlivem zearalenonu, může být doloženo koncentrací progesteronu, nálezem corpora lutea a přítomností reziduí plodových obalů. Ve studiích Young a King, Long a Diekman, Long *et al.* (1990; 1986a; 1986; 1982) byl po prvním trimestru nalezen u prasnic exponovaných zearalenonem nižší nebo nulový počet fetů. Byla však přítomna perzistentní corpora lutea potvrzena koncentrací progesteronu v séru. To je odpověď na otázku, jestli snížení počtu nebo absence plodů je výsledkem normální embryonální odúmrti nebo negativního vlivu zearalenonu na koncepci a fertilitu. Nepřítomnost fetů může být ještě doprovázena nálezem reziduálních fetálních membrán v uteru kolem 40. dne po připuštění (Long a Diekman, 1986; Long a Diekman, 1984).

Přesný mechanismus ovlivnění embryonálního přežívání působením zearalenonu není stále zcela objasněn. U prasat zabřeznutí a vývoj embrya záleží na komplexu interakcí mezi blastocystou a uterem. Existuje hypotéza, že Zea může způsobovat změny v sekreční aktivitě endometria. Etienne a Jemmali (1982) ohlásili, že u prasnic krmených zearalenonem byla v 80. dnu březosti snížena váha dělohy bez snížení její délky. Z toho vyplývá, že stěna uteru byla slabší než u kontrolní skupiny. Podáváním 1 ppm ZEA nedocházelo ke vzniku morfologických změn v endometriu. Long a Diekman a Long *et al.* (1984; 1982) popisují, že velikost a mikroskopické změny reprodukčních orgánů u prasnic kolem 40 dne březosti krmených Zea jsou podobné jako u kontrolních zvířat. Prasnicím, kterým byl podáván Zea v dávce 108 mg denně po dobu 4 – 5 dnů na začátku březosti, histologické změny zjištěné 1 měsíc po připuštění odpovídaly stádiu reprodukčního cyklu (Long a Diekman, 1986). V podobném experimentu, kdy byl uterus po expozici Zea vypláchnut, nebyly ovlivněny migrace blastocyst ani intrauterinní koncentrace progesteronu a estradiol – 17 β. Na rozdíl od neexponované skupiny, docházelo ke změně obsahu Ca, Mg a Zn ve výplašku dělohy. 100 mg progesteronu proti toxickému vlivu zearalenonu nepůsobilo.

V neposlední řadě se uvádí i vliv zearalenonu na sekreci hormonů. V některých případech byla popsána nižší koncentrace prolaktinu a nižší hladina LH několik dnů po aplikaci toxinu (Long a Diekman, 1986).

4 Metodika a materiály

Do pokusu bylo zařazeno 36 prasniček F1 kříženek plemen Landrace - Bílé ušlechtilé ve věku 7 – 8 měsíců o hmotnosti 125 – 140 kg. Zvířata byla 5 dní před naskladněním odčervena (Ivomec, fa Merial). Po naskladnění byla zvířata na základě věku a hmotnosti rovnoměrně roztríděna do 4 skupin po devíti zvířatech. Prasata byla nezaměnitelně označena vrubováním již v původním chovu. Ustájena byla v individuálních kotcích s individuálním přísunem krmiva vybalancovaného v základních ukazatelích. Skupina I a II byla krmena krmnou směsí se zvýšeným obsahem sóji (KS-S), skupina III a IV krmnou směsí, ve které byla sója nahrazena rybí moučkou (KS-M).

Obsah genisteinu, daidzeinu a zearalenonu v mg/kg krmných směsí byl:

- KS-S (Sk. I Sója) = 165, 107, 0.
- KS-M (Sk. IV Moučka) = 0; 0; 0.

Vlastní experiment byl zahájen u jednotlivých prasniček 7 dní po odeznění 1. zjištěné říje, během experimentu byly uvedené krmné dávky doplňovány 2x denně perorální aplikací genisteinu ve skupinách I a II, zearalenonu ve skupinách II a III, resp. vehikula ve skupině IV:

- sk. I. – krmná směs s vyšším obsahem sóji + genistein (Sk. I Sója)
- sk. II. – krmná směs s vyšším obsahem sóji + genistein + zearalenon (Sk. II Zea + Sója)
- sk. III. – krmná směs bez sóji + zearalenon (Sk. III Zea + Moučka)
- sk. IV. – krmná směs bez sóji (Sk. IV Moučka).

4.1 *Aplikace zearalenonu a genisteinu.*

Čistý zearalenon, resp. genistein (Sigma-Aldrich, ltd.) byl rozpuštěn v 60 % ethylalkoholu v poměru 1 mg Zea: 1 ml rozpouštědla, resp. v poměru 1 g GEN: 3 ml rozpouštědla. Tyto pracovní roztoky zearalenonu a genisteinu byly podávány v objemu 1,5 ml, resp. 0,3 ml perorálně 2 x denně v 10 ml 10 % cukerného roztoku. Zvířata ve skupině IV dostávala pouze vehikulum - cca 2 ml v 10 ml 10 % cukerného roztoku. Dávka Zea představovala příjem 3 mg Zea na kus a den, což při denní dávce 2,3 kg krmné směsi odpovídalo kontaminaci krmiva 1,3 ppm. Denní dávka arteficiálně podávaného GEN činila 100 mg, celkový příjem sojových fytoestrogenů byl cca 725,6 mg.

4.2 *Klinický stav.*

Zvířata byla vážena při naskladnění a dále v pravidelných týdenních intervalech. Průběžně byl sledován zdravotní stav zvířat.

4.3 Detekce říje.

Denně, v období očekávané říje dvakrát denně byly u zvířat posuzovány zevní příznaky říje - zduření a zarudnutí vulvy, nástup reflexu nehybnosti. Pro zintenzivnění říjových projevů byl aplikován kančí pach (Boar - Mate) a 7. den po zahájení medikace byla do zjištění říje navýšena krmná dávka o 20 %.

4.4 Inseminace.

Zvířata byla po dobu trvání reflexu nehybnosti 2 x denně inseminována krátkodobě konzervovaným semenem z ISK Skršín (Natural, s.r.o.). V experimentu byly užívány dávky komerčně vyráběné od tří kanců plemene Landrace, k inseminaci byly použity vždy směsné dávky od dvou z nich.

4.5 Ukončení experimentu.

Březost byla zjišťována 22. – 26. den po inseminaci USG vyšetřením. Březím zvířatům byla 26. den březosti ukončena medikace. Zvířata jalová byla inseminována znovu v následující říji. U zvířat, která nezabřezla, byla medikace ukončena po 4 měsících sledování. Zvířata byla odporazena 30. – 36. den po ukončení medikace, tj. březí zvířata 56. – 63. den březosti.

4.6 Vyšetření post mortem.

Poraženým zvířatům byly odebrány pohlavní orgány. Následně byla zjišťována hmotnost ovarií, počet žlutých tělísek, hmotnost intaktní dělohy a hmotnost prázdné dělohy, hmotnost plodových obalů a plodových vod, hmotnost a počet selat a embryonální mortalita.

4.7 Statistické metody a sledované parametry

Ke statistickému vyhodnocení dat byl použit programová balík Statistica 8.0 CZ (Statsoft). Sledovány byly následující ukazatele: březost, úspěšnost inseminace, počet žlutých tělísek, hmotnost vaječníků, hmotnost dělohy – intaktní a bez selat, hmotnost plodových obalů, hmotnost plodových vod, počet selat, embryonální mortalita, hmotnost selat a průměrná hmotnost selete. Přednostně byla data analyzována prostřednictvím jednofaktorové analýzy rozptylu (ANOVA). Pokud nebyly splněny podmínky pro použití ANOVY, jako normální rozdělení dat a homogenita

rozptylů, byla použita neparametrická Kruskal-Wallisova ANOVA. Březost a úspěšnost inseminace jsme hodnotili χ^2 testem, při nesplnění podmínek očekávaných četností byl nahrazen dvouvýběrovým testem o shodě dvou relativních četností. K posouzení rozdílů mezi skupinami prasnic ve více proměnných najednou: počet žlutých tělísek, hmotnost vaječnicků, hmotnost dělohy, hmotnost plodových obalů, počet selat, hmotnost selat a průměrná hmotnost selete jsme použili vícerozměrnou analýzu rozptylu (MANOVA).

5 Výsledky

Při zhodnocení pokusných skupin na základě celého souboru sledovaných parametrů (počet žlutých tělísek, hmotnost vaječnicků, hmotnost dělohy, hmotnost plodových obalů, počet selat, hmotnost selat, průměrná hmotnost selete) vícerozměrná analýza rozptylu (MANOVA) prokázala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami. I když následné testy neumožnily jednoznačně prokázat, které ukazatele tyto rozdíly podmiňují nejvíce, je možné dovodit, že medikační schéma ovlivnilo stav experimentálních zvířat. V některých parametrech byl posun hodnot u zvířat medikovaných zearalenonem obdobný jak při zkrmování diety se sójou, tak při dietě s rybí moučkou, v některých parametrech však byly tendence v závislosti na dietě zcela opačné.

Zátěž experimentu se zřetelně nepromítla do zdravotního stavu samic

5.1 *Březost*

Nejvyšší počet březích prasnic byl dosažen ve skupinách Zea + Sója a Zea + Moučka. Zabřezlo po 16 prasnicích z 18. Nejhorších výsledků dosáhla skupina Moučka, zde zabřezlo pouze 5 prasnic z 9 (tabulka 1, graf 1).

Více březostí jsme zaznamenali u prasnic krmených zearalenonem než u těch, kterým jsme ho nepodávali.

Rozdíly mezi skupinami však nejsou statisticky významné. Rozdíl mezi počtem březích a jalových prasnic ve skupinách s aplikací zearalenonu a ve skupinách bez aplikace zearalenonu je na hranici statistické významnosti ($p = 0,0625$).

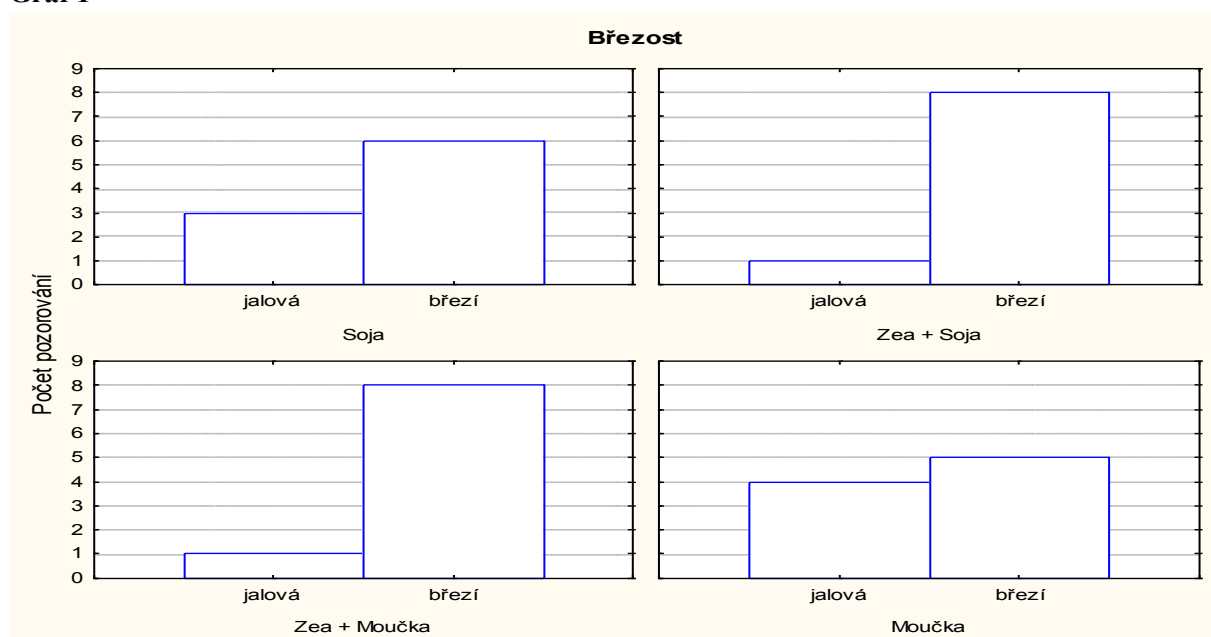
Významný vliv sóji na březost prokázán nebyl.

Prasničky krmené sójou zabřezávaly lépe než prasničky krmené krmnou směsí bez sóji, avšak rozdíl nebyl statisticky průkazný.

Tabulka 1

Skupina	Březost		
	Jalová	Březí	Celkem
Sk. I Sója	3	6	9
Sk. II Zea + Sója	1	8	9
Sk. III Zea + Moučka	1	8	9
Sk. IV Moučka	4	5	9
Celkem	9	27	36

Graf 1



5.2 Úspěšnost inseminace

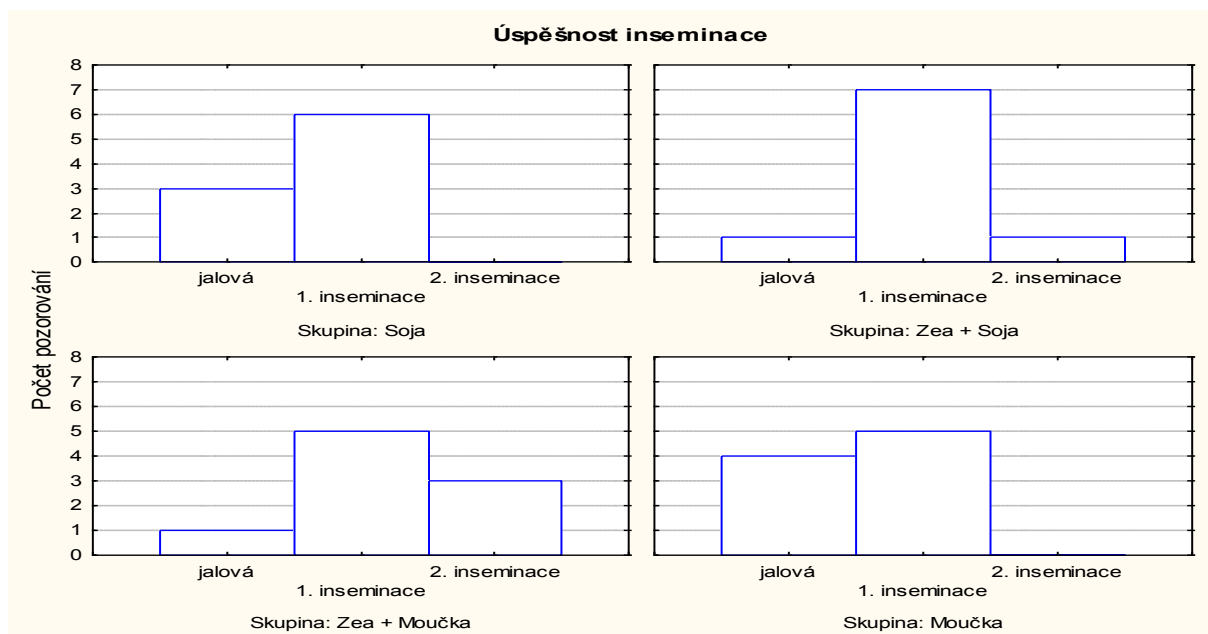
Byl hodnocen počet zvířat zabřezlých po 1. inseminaci, 2. inseminaci a počet zvířat, jež nezabřezla. Vliv zearalenonu na úspěšnost inseminace byl statisticky významný. Poměr počtu prasnic zabřezlých na 1. inseminaci ku prasnicím zabřezlých až na 2. inseminaci nebo vůbec, byl signifikantně vyšší u zvířat, kterým byl zearalenon podáván, než tomu bylo u zvířat bez podávání zearalenonu

Na úrovni jednotlivých pokusných skupin se rozdíly blížily hranici statistické významnosti ($p = 0,0776$). (tabulka 2, graf 2).

Tabulka 2

Skupina	Úspěšnost inseminace			
	Jalová	1. INS	2. INS	Celkem
Sk. I Sója	3	6	0	9
Sk. II Zea + Sója	1	7	1	9
Sk. III Zea + Moučka	1	5	3	9
Sk. IV Moučka	4	5	0	9
Celkem	9	23	4	36

Graf 2



5.3 Počet žlutých tělísek

Počet žlutých tělísek byl hodnocen pro oba vaječníky současně u březích zvířat. Nejvyšší počet žlutých tělísek jsme získali u prasnic skupiny Zea + Sója a nejnižší počet ve skupině Moučka. Tento rozdíl byl statisticky významný ($p < 0,05$) (tabulka 3, graf 3).

Dále byl patrný rozdíl v počtu žlutých tělísek mezi skupinou Zea + Moučka a Moučka. Tento rozdíl však byl na hranici statistické významnosti ($p = 0,051$).

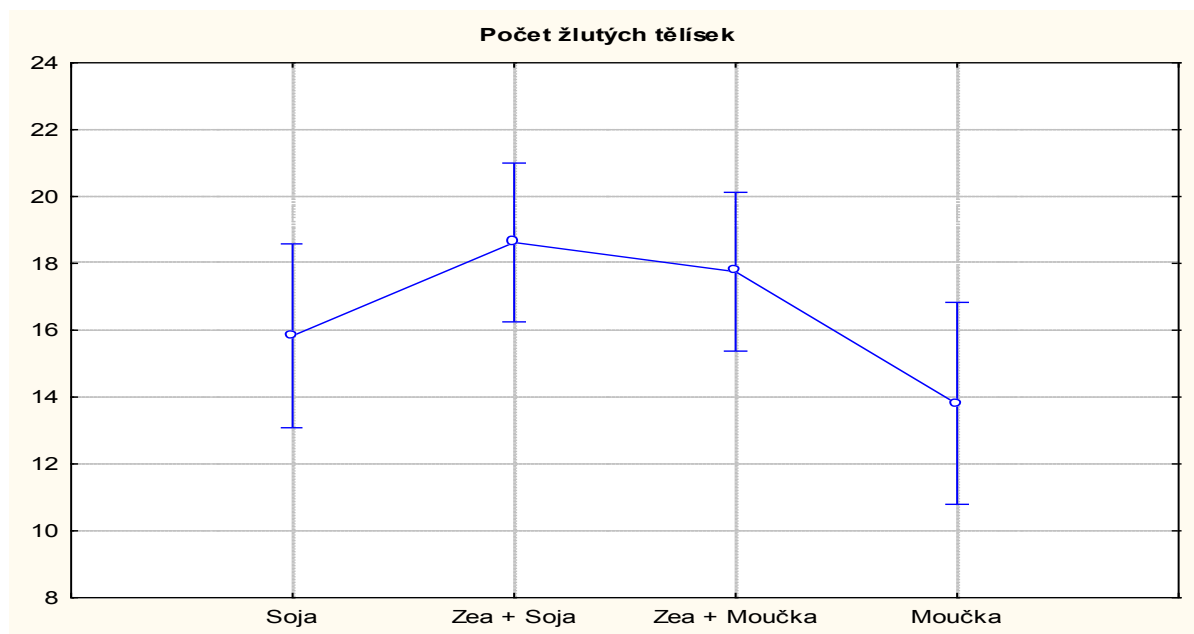
Rozdíl mezi zvířaty s aplikací zearalenonu a bez aplikace Zea byl statisticky významný ($p < 0,05$).

Tabulka 3

Skupina	Počet CL
Sk. I Sója	15,83 ^{ab}
Sk. II Zea + Sója	18,63 ^a
Sk. III Zea + Moučka	17,75 ^{ab}
Sk. IV Moučka	13,80 ^b

^{a,b} - hodnoty ve sloupcích označené různými indexy jsou statisticky významně rozdílné ($p < 0,05$).

Graf 3



5.4 Hmotnost vaječníků

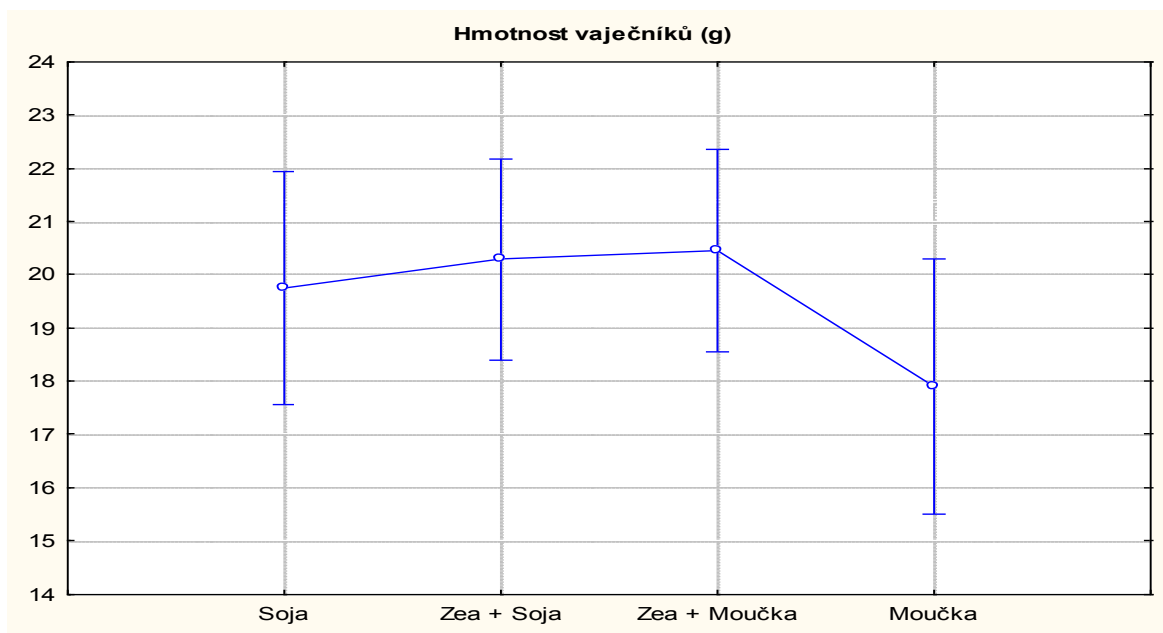
U každé prasničky byla hodnocena velikost ovárií na základě jejich hmotnosti (tabulka 4, graf 4).

Nejvyšší hmotnost vaječníků byla zjištěna u skupiny Zea + Moučka a nejnižší hmotnost u skupiny Moučka. Průměrné hodnoty parametrů byly ve skupinách se zearalenonem vyrovnané. Statistické rozdíly však nebyly významné.

Tabulka 4

Skupina	Hmotnost vaječníků (g)
Sk. I Sója	19,75
Sk. II Zea + Sója	20,29
Sk. III Zea + Moučka	20,45
Sk. IV Moučka	17,90

Graf 4



5.5 Hmotnost dělohy – intaktní a prázdné bez selat

Každá děloha byla vážena dvakrát. Nejprve pro zjištění hmotnosti dělohy po oddělení pochvy a poševní předsíně (Hmotnost intaktní dělohy) a dále pro zjištění hmotnosti po vyjmutí selat (Hmotnost dělohy bez selat).

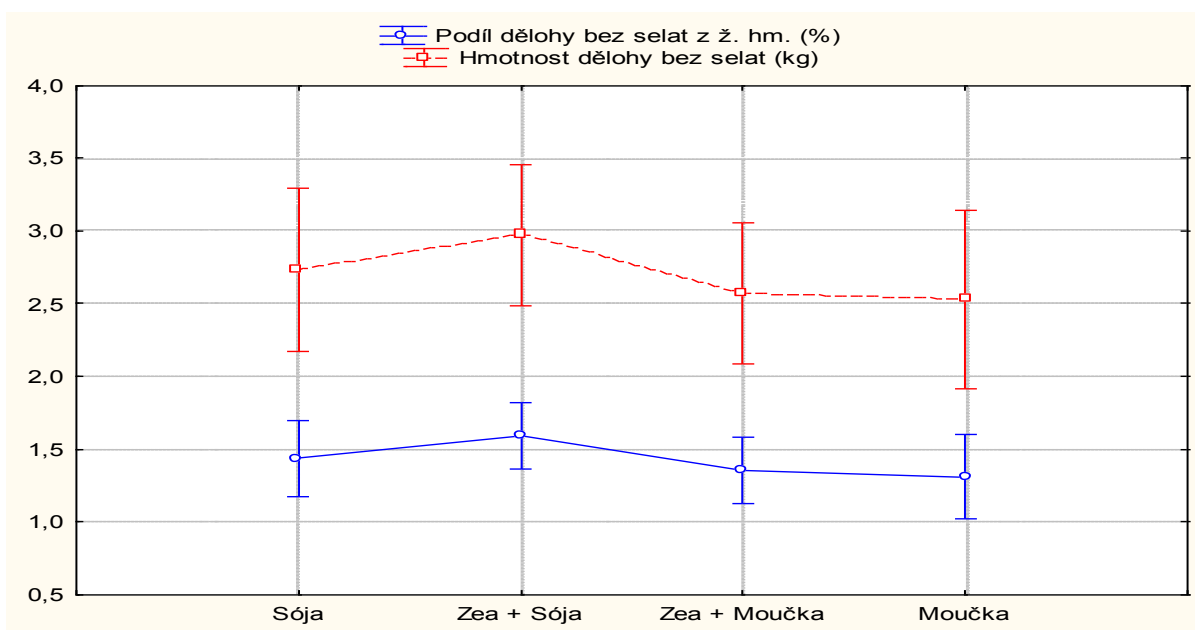
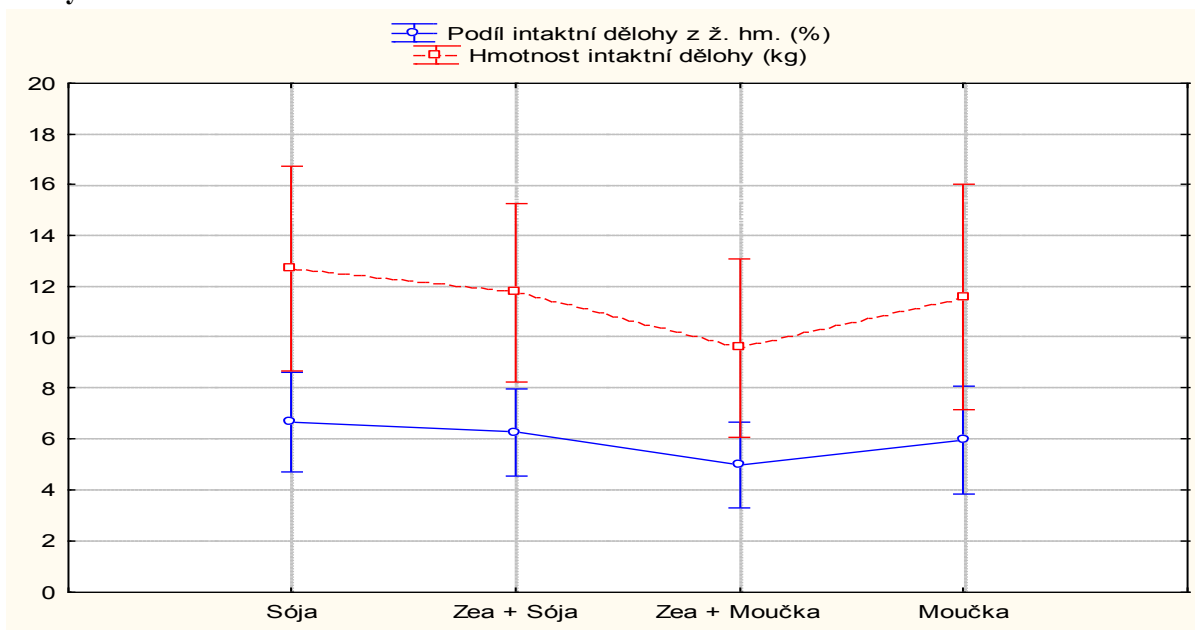
Nejvyšší hmotnost intaktní dělohy a i hmotnostní podíl intaktní dělohy ze ž.hm. zvířete byla ve skupině Sója a nejnižší ve skupině Zea + Moučka. Nejvyšší hmotnost dělohy bez selat a i hmotnostní podíl dělohy bez selat ze ž.hm. zvířete byla ve skupině Zea + Sója a nejnižší ve skupině Moučka.

Rozdíly mezi skupinami nebyly statisticky významné (tabulka 5, grafy 5).

Tabulka 5

Skupina	Hmotnost intaktní dělohy (kg)	Hmotnostní podíl intaktní dělohy z celkové hmotnosti prasnice (%)	Hmotnost dělohy bez selat (kg)	Hmotnostní podíl dělohy bez selat z celkové hmotnosti prasnice (%)
Sk. I Sója	12,71	6,66	2,73	1,44
Sk. II Zea + Sója	11,74	6,26	2,97	1,59
Sk. III Zea+Moučka	9,58	4,97	2,57	1,34
Sk. IV Moučka	11,57	5,95	2,53	1,31

Grafy 5



5.6 Hmotnost plodových obalů

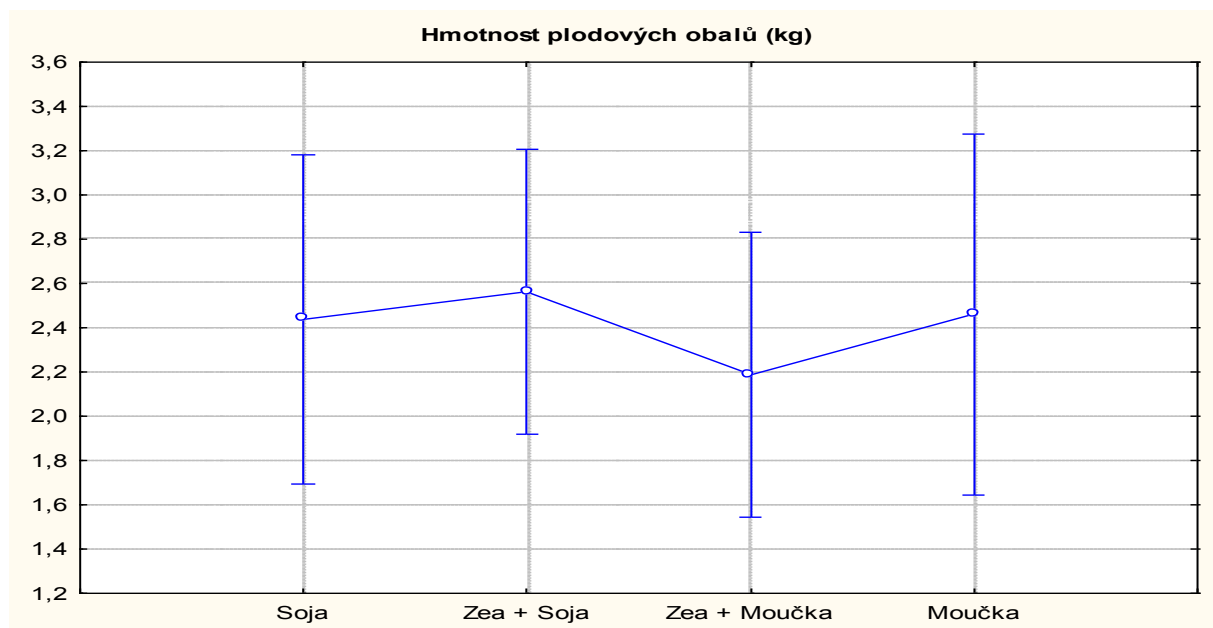
Nejvyšší hmotnost plodových obalů byla zjištěna u prasniček skupiny Zea + Sója a naopak nejnižší hmotnost plodových obalů byla ve skupině Zea + Moučka (tabulka 6, graf 6).

Neprokázali jsme statisticky významný rozdíl mezi skupinami v hmotnosti plodových obalů.

Tabulka 6

Skupina	Hmotnost plodových obalů (kg)
Sk. I Sója	2,44
Sk. II Zea + Sója	2,94
Sk. III Zea + Moučka	2,19
Sk. IV Moučka	2,46

Graf 6



5.7 Hmotnost plodových vod

Hmotnost plodových vod jsme stanovili jako rozdíl mezi hmotností intaktní dělohy a hmotností dělohy bez selat a plodových obalů a selat.

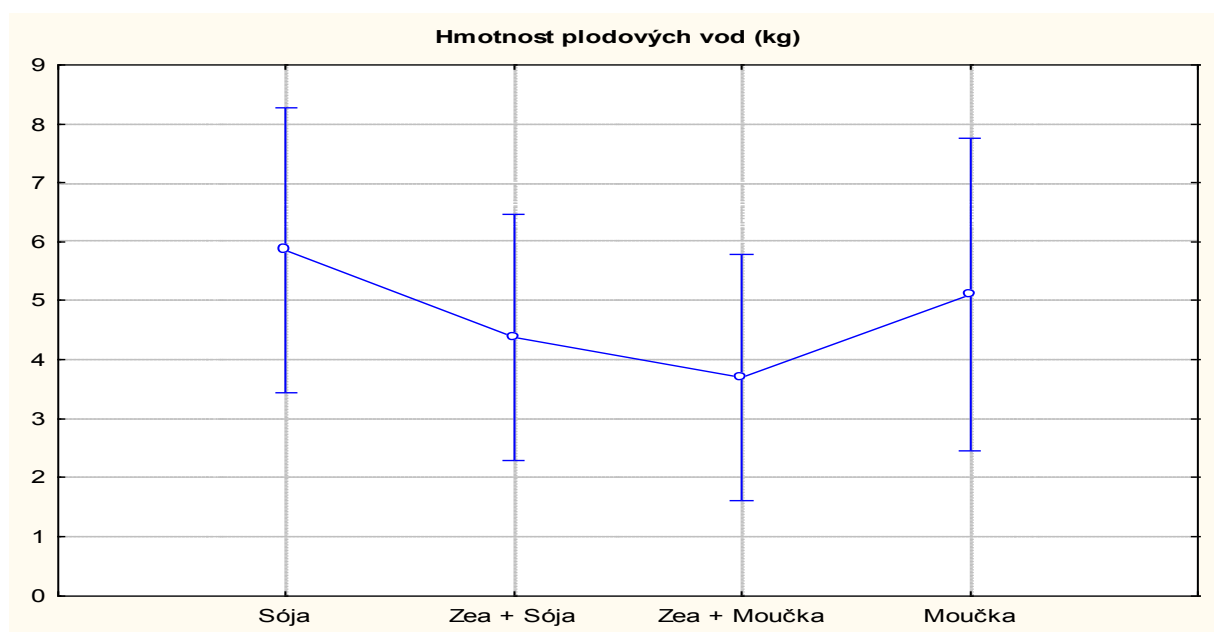
Nejvyšší hmotnost plodových vod byla ve skupině Sója a nejnižší ve skupině Zea + Moučka.

Rozdíly mezi jednotlivými skupinami nejsou statisticky významné. Rozdíly mezi skupinami s aplikací zearalenonu a bez aplikace zearalenonu byly také statisticky neprůkazné ($p > 0,05$).

Tabulka 7

Skupina	Hmotnost plodových vod (kg)
Sk. I Sója	5,86
Sk. II Zea + Sója	4,38
Sk. III Zea + Moučka	3,70
Sk. IV Moučka	5,11

Graf 7



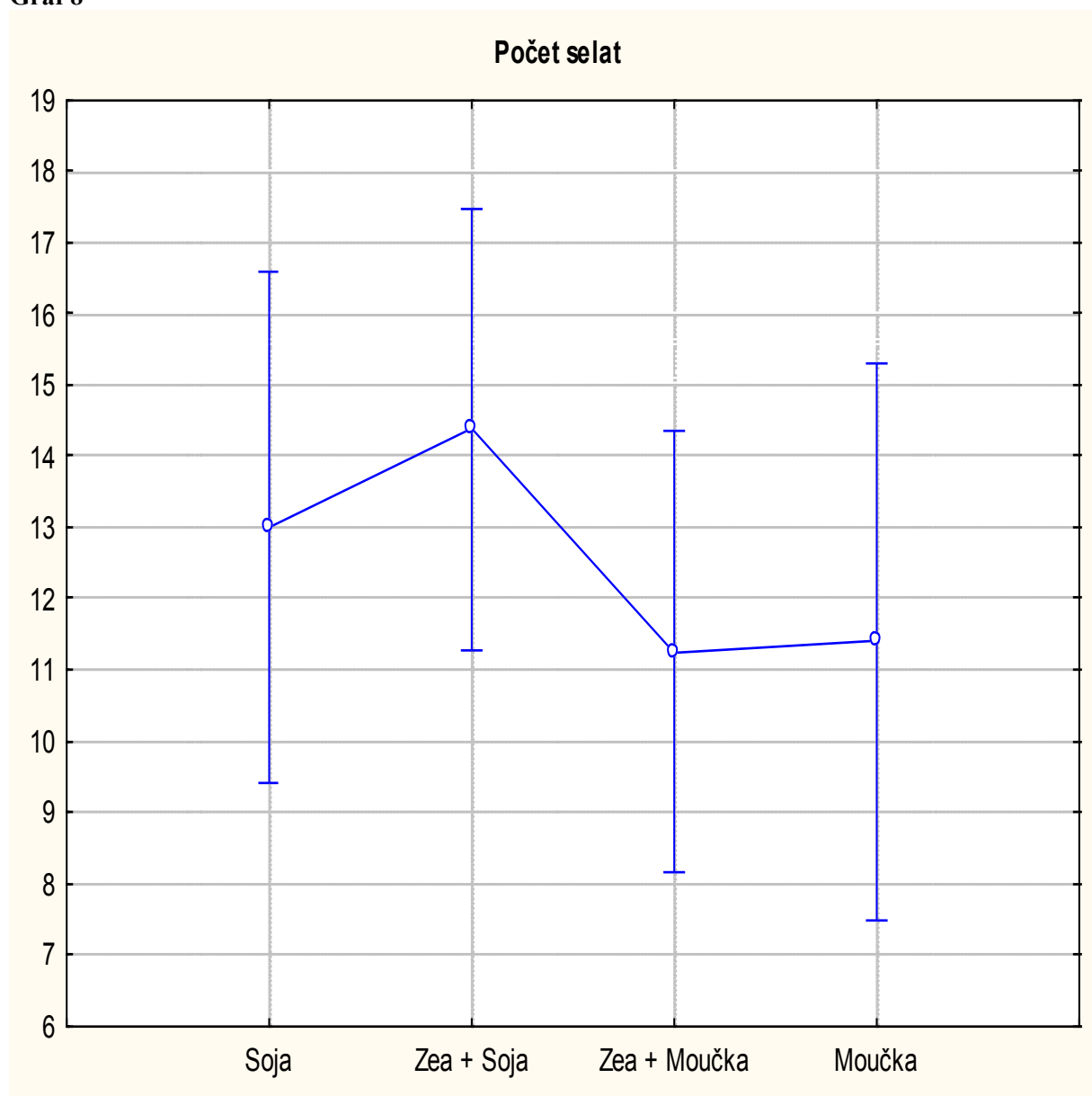
5.8 Počet selat

Nejvyšší počet selat jsme získali u prasniček skupiny Zea + Sója. Ve skupině Zea + Moučka měly prasničky nejméně selat (tabulka 8, graf 8)

Rozdíly v počtu selat mezi skupinami nebyly statisticky významné.

Tabulka 8

Skupina	Počet selat
Sk. I Sója	13,00
Sk. II Zea + Sója	14,38
Sk. III Zea + Moučka	11,25
Sk. IV Moučka	11,40

Graf 8

5.9 Embryonální mortalita

Embryonální mortalita byla odhadnuta jednak jako rozdíl počtu CL a počtu selat a také jako podíl počtu selat a počtu CL (tabulka 9, grafy 9).

Odhadovaná embryonální mortalita při rozdílu počtu CL a počtu selat. Nejvyšší embryonální mortalita je ve skupině Zea + Moučka a nejnižší ve skupině Moučka.

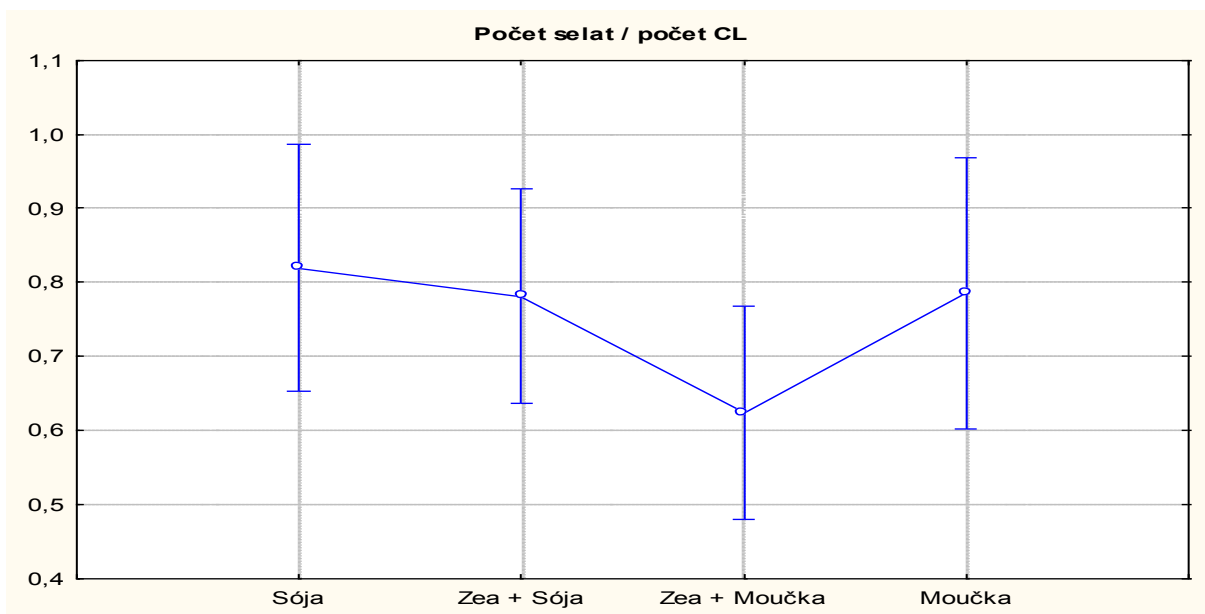
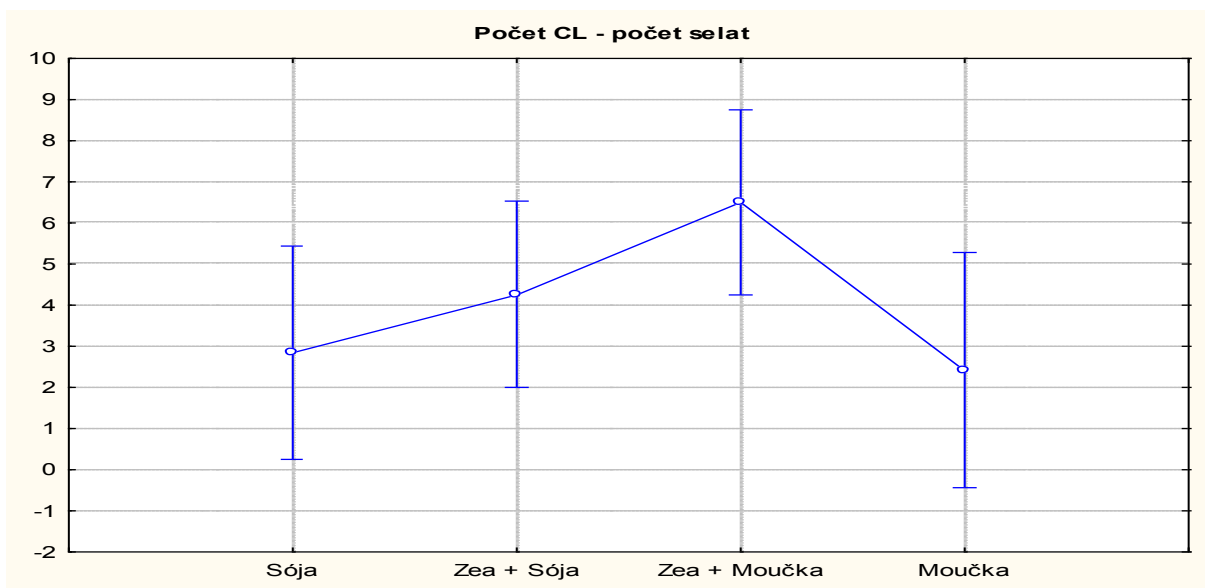
Odhadovaná nejvyšší embryonální mortalita byla v případě podílu, kdy jsme vzali v úvahu, že vyšlý výsledek podílu musí být odečten od všech zvířat, a tudíž byla nejvyšší v případě skupiny Zea + Moučka a nejnižší ve skupině Sója.

U rozdílu Počet CL – Počet selat byl rozdíl mezi skupinou zvířat s aplikací zearalenonu a bez aplikace zearalenonu statisticky významný ($p < 0,05$). U podílu Počet selat / Počet CL byl rozdíl mezi skupinou s aplikací zearalenonu a bez aplikace zearalenonu statisticky nevýznamný ($p > 0,05$).

Tabulka 9

Skupina	Počet CL - Počet selat	Počet selat / Počet CL
Sk. I Sója	2,83	0,82
Sk. II Zea + Sója	4,25	0,78
Sk. III Zea + Moučka	5,25	0,64
Sk. IV Moučka	2,4	0,79

Grafy 9

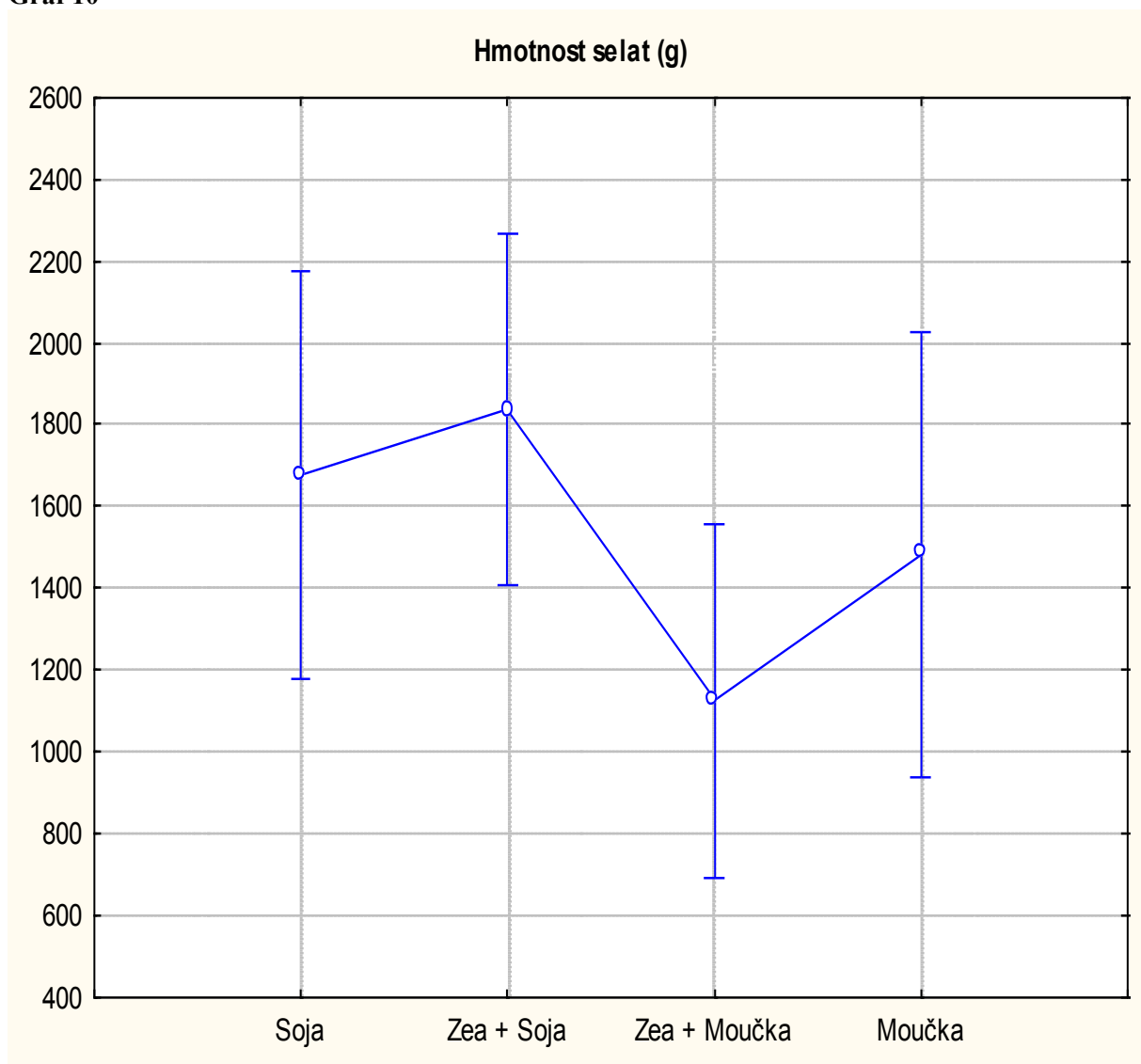


5.10 Hmotnost selat

Nejvyšší hmotnost selat byla získána ve skupině Zea + Sója a nejnižší ve skupině Zea + Moučka (tabulka 10 graf 10). Rozdíly nebyly statisticky významné.

Tabulka 10

Skupina	Hmotnost selat (g)
Sk. I Sója	1675,95
Sk. II Zea + Sója	1836,73
Sk. III Zea + Moučka	1123,91
Sk. IV Moučka	1483,14

Graf 10

5.11 Průměrná hmotnost selete

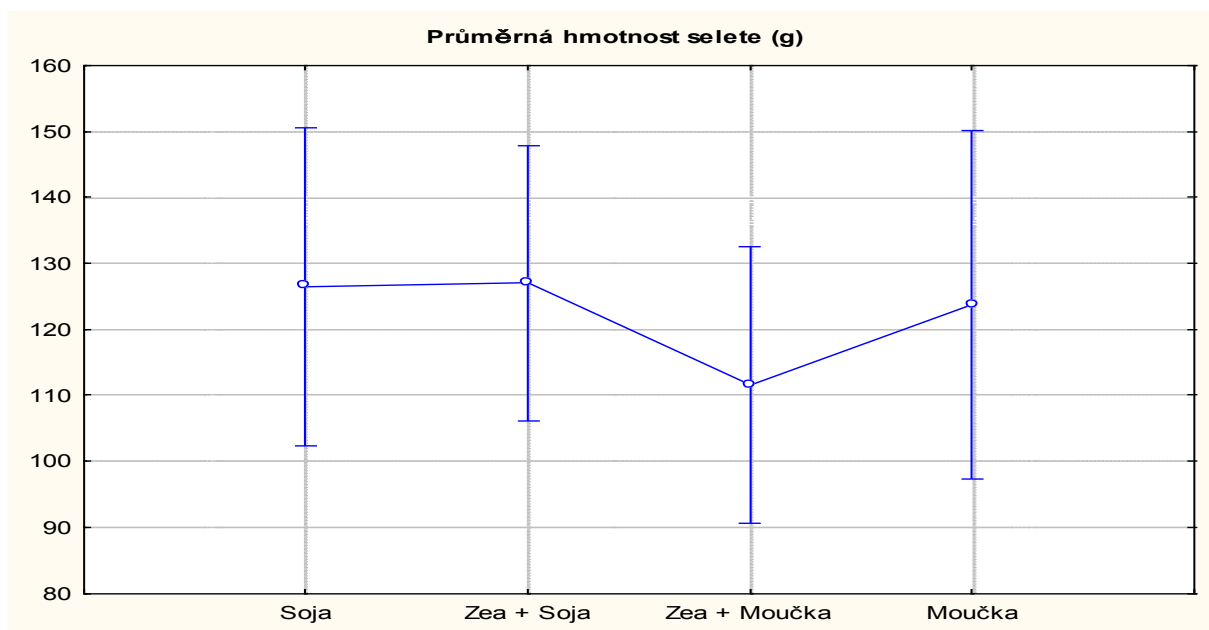
Nejvyšší průměrná hmotnost selete se objevila u prasnic ve skupině Zea + Sója a nejnižší ve skupině Zea + Moučka (tabulka 11, graf 11).

Mezi skupinami nebyly prokázány statisticky významné diference.

Tabulka 11

Skupina	Průměrná hmotnost selete (g)
Sk. I Sója	126,51
Sk. II Zea + Sója	127,01
Sk. III Zea + Moučka	111,54
Sk. IV Moučka	123,76

Graf 11



6 Diskuze

Skrytý průběh bez klinických příznaků onemocnění může být vážným problémem u chronických mykotoxikóz (Cavret *et al.*, 2006, Kalač a Míka, 1997, Kummer *et al.*, 2001). V případě zearalenonu jsou klinickými příznaky myšleny hyperémie, edematická rodidla s kalným vaginálním výtokem, zvětšení mléčné žlázy, hypertrofie prsních bradavek a v těžkých případech vaginální a rektální prolaps s následnou infertilitou, popř. abortem (Kalač a Míka, 1997). V našem experimentu také nebyly zjištěny výrazné změny klinického stavu, zřejmě procesy probíhaly skrytě a nebo díky nízké dávce zearalenonu a délce experimentu k těmto změnám ani nedošlo. Nicméně při zhodnocení pokusných skupin na základě celého souboru sledovaných parametrů (počet žlutých tělísek, hmotnost vaječníků, hmotnost dělohy, hmotnost plodových obalů, počet selat, hmotnost selat, průměrná hmotnost selete) vícerozměrná analýza rozptylu (MANOVA) prokázala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami. I když následné testy neumožnily jednoznačně prokázat, které ukazatele tyto rozdíly podmiňují nejvíce, je možné dovodit, že medikační schéma ovlivnilo stav experimentálních zvířat. V některých parametrech byl posun hodnot u zvířat medikovaných zearalenonem obdobný jak při zkrmování diety se sójou, tak při dietě s rybí moučkou, v některých parametrech však byly tendence v závislosti na dietě zcela opačné.

Dále: Zea svými estrogenizačními účinky ovlivňuje ovulaci (Kalač a Míka, 1997, Radostis *et al.*, 1997). Young a King (1986) a Etienne a Jemmalí (1982) ale říkají, že suplementací zearalenonu před pářením nemá docházet k ovlivnění koncepce, míry ovulace ani počtu mláďat, životaschopnosti selat a stupně embryonální mortality. Také může mít vliv na zabřezávání i následný průběh březosti. Long a Diekman (1986) zdůrazňují důležitost role fáze březosti, kdy je prasnice vystavena účinkům toxinu. Pokud je prasnice ovlivněna zearalenonem během 7. – 10. dne březosti, dochází k výrazné embryonální mortalitě, zatímco v případě krmení toxinu 2. - 6. nebo 11. - 15. den březosti nebyl popsán žádný negativní efekt (Long a Diekman, 1986). Vesměs jsou popisovány účinky na reprodukci vyšších dávek jako negativní (Osweiler, 2000, Kalač a Míka, 1997, Kummer *et al.*, 2001) V našem experimentu jsme zaznamenali významně vyšší procento březích zvířat ve skupinách medikovaných Zea, stejně jako byly v těchto skupinách významně lepší výsledky zabřezávání po jednotlivých inseminacích. To je v rozporu s tvrzeními, že působení zearalenonu na reprodukční funkce má mít negativní důsledky, které popisují Kummer *et al.*, Zwierzchowski *et al.*, Danicke *et al.*, Kalač a Míka a Radostis *et al.* (2001, 1997, 2006; 2005, 1997) Jejich publikace popisují příznaky hyperestrogenismu charakterizované zvětšením mléčné žlázy, zarudnutím a edematickým 3 až 4 násobným zvětšením vulvy, otokem a prolapsem vaginy u prasniček (až u 30 %). Možným vysvětlením našich výsledků je nízká dávka zearalenonu.

Doboszynska *et al.*, (2005) popsali obecně celkové a histologické změny u prepubertálních prasniček krmených vyššími dávkami zearalenonu jako je ztlustěná vrstva cortex s vysokým počtem

primárních folikulů a rostoucích ovariálních folikulů různých velikostí a postupná degenerace a atrofie ovárií při vyšších dávkách zearalenonu. Ale u nás počet ovulovaných folikulů a počet žlutých tělísek má vyšší výsledky ve skupinách se zearalenonem, ale je to možná tím, že máme nízké dávky po relativně krátkou dobu experimentu. Etienne et Jemmali, 1982 zjistili, že prasnice s prodlouženým cyklem vykazují zvýšenou koncentraci progesteronu v plazmě, což mělo za následek perzistenci žlutých tělísek. Anestrus byl potvrzen absencí corpora albigenia a nálezem corpora lutea. Podobný projev pseudogravidity také popisují Young a King (1986) u pubertálních prasniček po konzumaci 6 – 9 ppm zearalenonu ode dne po první říji.

Alm *et al.*, 2006 zjistili, že je u prasnic uterus výrazně zvětšen, neboť docházelo k proliferaci sliznice a svaloviny. Young a King, 1981 zjistili mikroskopické změny jako edém a ztluštění (zesílení) uteru způsobené kombinací hypertrofie a hyperplazie endometria a myometria. Dále Young a King (1986) zjistili, že děložní rohy jsou edematózní a po transversální sekci není patrně téměř žádné lumen. Váha dělohy byla téměř dvojnásobná oproti zvířatům, která nejsou ovlivněna toxinem. Etienne a Jemmali (1982) ve své práci popisují, že došlo u prasnic krmených zearalenonem v 80. dnu březosti ke snížení váhy dělohy, která však nebyla doprovázena snížením její délky. Také u nás došlo k neprůkaznému trendu vyšší hmotnosti dělohy a možné edematizaci děložních rohů, ve skupinách krmených sójou a zearalenonem a sójou.

Podobně neprůkazná byla i tendence k nižší hmotnosti plodových vod u *Zea* medikovaných skupin.

Při zkrmování zearalenonem může docházet k ovlivnění počtu novorozených selat ve smyslu snížení počtu vrhu, dále nižší životaschopnost mláďat po narození, snížení hmotnosti selat atd. Je to zdokumentováno experimenty autorů (Young a King, 1986; Etienne a Jemmali, 1982).

U březích prasnic dochází vlivem *Zea* k rané embryonální mortalitě, k malformaci plodů, objevují se menší vrhy se sníženou hmotností selat a následnými brzkými neonatálními mortalitami (Osweiler, 2000). Ve studiích Young a King, Long a Diekman, Long *et al.* (1990; 1986a; 1986; 1982) byl po prvním trimestru nalezen u prasnic exponovaných zearalenonem nižší nebo nulový počet fětů. Byla však přítomna perzistentní corpora lutea, s odpovídající progesteronovou koncentrací v séru. Nepřítomnost fětů může být ještě doprovázena nálezem reziduálních fetálních membrán v uteru kolem 40. dne po přípuštění (Long a Diekman, 1986; Long a Diekman, 1984). Rozlišení, zda se jedná o ranou embryonální odúmrt' nebo embryonální mortalitu způsobenou vlivem zearalenonu, může být doloženo jednak progesteronovou koncentrací, tak nálezem corpora lutea a přítomností reziduí plodových obalů. U prasat zabřeznutí a vývoj embrya záleží na komplexu interakcí mezi blastocystou a uterem. Existuje hypotéza, že *Zea* může způsobovat změny v sekreční aktivitě endometria (Young a King, 1981). Při pitvě byly zaznamenány zbytky plodových obalů, počet žlutých tělísek převyšoval počet nalezených plodů. Stupeň rozkladu plodových obalů byl velmi variabilní, takže bylo obtížné

stanovit skutečné počty embryonální mortality, proto ji jen odhadujeme z počtu CL a počtu selat. Rozdíly mezi našimi skupinami nebyly statisticky průkazné. Během vyhodnocování parametrů *post mortem* jsme našli embryonální odumrtí rozdílného stupně. Odhadovaná embryonální mortalita byla v rozdílu počtu CL a počtu nalezených selat signifikantně vyšší ve skupinách se zearalenonem, ovšem podíl počtu selat a počtu CL byl ve skupinách vyrovnán, vyjma neprůkazné snížení ve skupině krmené zearalenonem a moučkou. Rozdíl v počtu CL a plodů tak spíše korespondoval významně vyšším počtem žlutých tělísek u Zea skupin.

V mnoha experimentech dochází ke snížení počtu selat ve vrhu nebo dokonce k odumření celého vrhu. Je to přisuzováno vystavení prasat abnormálně vysokým dávkám zearalenonu: 64 ppm 60 a 90 ppm (Long a Diekman, 1984) nebo 108 mg denně (Long a Diekman, 1986). Vystavení nižším dávkám do 30 ppm (Long a Diekman, 1984) nevedlo k signifikantnímu snížení počtu narozených selat. Třebaže z výše uvedeného vyplývá na dávce závislý efekt, mnohé experimenty dokazují, že méně jak 60 ppm ZEA mělo za následek narození menších selat a nižší životaschopnost mláďat. V souladu s pracemi Long a Diekman (1986; 1984) není hmotnost plodů alterována při krmení prasnic dietou obsahující vysokou hladinu Zea. Ačkoliv kontaminované krmivo je podáváno během 4–13 dnů a 16 dnů před začátkem březosti. Etienne a Jemmali (1982) zjišťují, že váha plodů v 80. dnu březosti je snížena o 24 %. Young a King (1986a) publikují, že prasničky krmeny dietou obsahující více jak 3 ppm Zea během březosti vykazují snižování váhy selat při narození se zvyšující se dávkou toxinu 1,42; 1,3; 1,21; a 1,05 kg při 0, 3, 6, a 9 ppm Zea. Například Long *et al.* (1982) ukazují, že incidence málo početných vrhů (1 - 3 selat) stoupá se zvyšující se dávkou Zea od 0, 7, 38 do 64 ppm. V naší studii jsme nezjistili průkazné rozdíly v počtu selat, hmotnosti selat ani průměrné hmotnosti selat. Zajímavé je, že ve všech třech sledovaných parametrech se – stejně jako v případě hmotnosti plodových vod - projevil nevýznamný trend spíše navýšení hodnot při podávání Zea v kombinaci se sójovou dietou a naopak jejich snížení při podávání Zea v kombinaci s dietou bez sóji.

7 Závěry a doporučení

Vícerozměrná analýza rozptylu (MANOVA) prokázala statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými experimentálními skupinami. I když následné testy neumožnily jednoznačně prokázat, které ukazatele tyto rozdíly podmiňují nejvíce, je možné dovodit, že medikační schéma ovlivnilo stav experimentálních zvířat.

Vyšlo nám, že zabřezávání je vyšší ve skupinách krmených zearalenonem (zabřezlo 16 z 18 prasnic) narozdíl od skupin krmených jen sójou (zabřezlo 6 z 9 prasnic) a nebo pouze moučkou (zabřezlo jen pět prasnic z devíti). Hranici statistické významnosti se blížily rozdíly mezi jalovými a březími samicemi u skupin s aplikací zearalenonu a bez aplikace zearalenonu ($p = 0,0625$). Zvířata medikovaná Zea také častěji zabřezla po 1. inseminaci, rozdíly v úspěšnosti inseminace byly opět signifikantní. Počet ovulovaných folikulů vyjádřený počtem žlutých tělísek (CL) byl významně vyšší ve skupinách se zearalenonem, stejně jako rozdíl mezi počtem CL a počtem plodů. U hmotnosti vaječníků nám vyšly ač vyrovnané, tak statisticky nevýznamné rozdíly. Dále nám statisticky neprůkazně vyšly hmotnosti děloh a jejich hmotnostní podíly (intaktní děloha a děloha bez selat). U proměnných Hmotnost plodových obalů a plodových vod jsme získali neprůkazné diference. Ve skupinách krmených sójou a zearalenonem a sójou jsme zaznamenali okrsky edematozní děložní sliznice. Ve všech skupinách jsme zaznamenali zbytky plodových obalů, svědčící o embryonální mortalitě. S ohledem na rozdílný stupeň rozkladu ovšem nebylo možno stanovit přesný počet odumřelých zárodků. Pro odhad stupně embryonální mortality byl stanoven jednak rozdíl počtu CL a selat, jednak podíl počtu selat a CL. Zatímco první ukazatel byl významně vyšší u skupin ošetřených Zea, ve druhém jsme zjistili pouze statisticky neprůkaznou tendenci. Rozdíly v parametrech „počet selat“, „hmotnost selat“, „průměrná hmotnost selete“, „hmotnost dělohy, plodových obalů a vod“ byly statisticky neprůkazné. U většiny se ale projevila tendence k nejvyšším hodnotám ve skupině Zea + Sója a naopak k nejnižším ve skupině Zea + Moučka.

Použitá velmi nízká dávka zearalenonu zřejmě působila na některé parametry reprodukční výkonnosti prasniček spíše stimulačně. Současně jsme pozorovali tendence k opačnému efektu u krmné směsi se sójou krmné směsi s rybí moučkou. To je v souladu s poznatky o duálním působení řady xenoestrogenů v závislosti na dávce a hormonálním profilu plemenic.

Přesto, že se zdá, že nízké dávky zearalenonu působí vnašem experimentu někdy spíše stimulačně, neměla by se problematika zaplísnění krmiv podceňovat – ve vyšších dávkách je negativní působení Zea jednoznačně prokázáno.

Zásadně nezkrmujeme zaplísněná krmiva včetně siláží. Prevence by měla být primárním cílem, protože určité podmínky prostředí během růstu sklizně plodin ovlivnit nelze. Použití inhibitorů plísni a mykotoxinových absorbentů by se mělo stát běžnou součástí krmného programu.

8 Seznam použité literatury

- Abbas H.K., Mirocha C.J., Kommedahl T., Vesonder R.F., Golinski P. (1989): Production of trichothecene and non-trichothecene mycotoxins by *Fusarium* species isolated from maize in Minnesota. *Mycopathologia* 108:55-8. ISSN: 0301-486X.
- Allen N.K., Mirocha C.J., Aakhus-Allen S., Bitgood J.J., Weaver G., Bates F. (1981): Effect of dietary zearalenone on reproduction of chickens. *Poult Sci* 60:1165-74. ISSN: 0032-5791.
- Allen N.K., Mirocha C.J., Weaver G., Aakhus-Allen S., Bates F. (1981): Effects of dietary zearalenone on finishing broiler chickens and young turkey poults. *Poult Sci* 60:124-31. ISSN: 0032-5791.
- Alm H., Brussow K.P., Torner H., Vanselow J., Tomek W., Danicke S., Tiemann U. (2006): Influence of *Fusarium*-toxin contaminated feed on initial quality and meiotic competence of gilt oocytes. *Reproductive toxicology* 22 (1):44-50. ISSN 0890-6238.
- Benham C.L. (1981): Moulds and mycotoxins in animal feedstuffs 1980. Proceeding of a fourth meeting on mycotoxins in animal disease. MAFF Reference book 360 38-40. ISBN-10: 0112415156.
- Bennett J.W., Klich M. (2003): Mycotoxins. *Clin* 16:497-516. Print ISSN: 0021-972X.
- Benzoni, E., Minervini, F., Giannoccaro, A., Fornelli, F., Vigo, D., Visconti, A. (2008): Influence of in vitro exposure to mycotoxin zearalenone and its derivatives on swine sperm quality. *Reproductive Toxicology* 25:461-467. ISSN 0890-6238.
- Betina V. (1990): Mykotoxíny. Alfa Bratislava, Bratislava, 284 s.
- Biehl M.L., Prelusky D.B., Koritz G.D., Hartin K.E., Buck W.B., Trenholm H.L. (1993): Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 121:152-9. ISSN: 0041-008X.
- Biehl M.L., Prelusky D.B., Koritz G.D., Hartin K.E., Buck W.B., Trenholm H.L. (1993): Biliary excretion and enterohepatic cycling of zearalenone in immature pigs. *Toxicol Appl Pharmacol* 121:152-9. ISSN: 0041-008X.
- Bories G., Suarez A.F. (1989): Profiling of free and conjugated [3H] zeranol metabolites in pig plasma. *Journal of Chromatography* 489:191-7. ISSN 0021-9673.
- Bories G.F., Perdu-Durand E.F., Sutra J.F., Tulliez J.E. (1991): Evidence for glucuronidation and sulfation of zeranol and metabolites (taleranol and zearalanone) by rat and pig hepatic subfractions. *Drug Metab Dispos* 19:140-3. ISSN: 0090-9556.
- Boutibonnes P. (1979): [Antibacterial activity of zearalenone]. *Can J Microbiol* 25:421-2. ISSN 0008-4166.
- Cavret S., Lecoœur S. (2006): Fusariotoxicosis. *Annales de médecine vétérinaire* 150 (1):43-55. ISSN 0003-4118.
- Danicke S., Brussow K. P., Valenta H., Ueberschar K. H., Tiemann U., Schollenberger M. (2005): On the effects of graded levels of *Fusarium* toxin contaminated wheat in diets for gilts on feed intake, growth performance and metabolism of deoxynivalenol and zearalenone. *Molecular nutrition & Food research* 49 (10):932-943. ISSN 1613-4125.
- Demain A.L. (1983): New applications of microbial products. *Science* 219:709-14. ISSN 0021-8812.

- Di Menna M.E., Lauren D.R., Smith W.A. (1991): Effect of incubation temperature on zearalenone production by strains of *Fusarium crookwellense*. *Mycopathologia* 116:81-5. ISSN: 0301-486X.
- Doboszynska T., Jarczyk A., Rogiewicz A., Jana B., Andronowska A., Postek A. (2005): Effect of zearalenone on morphological features of ovaries in young gilts. *Medycyna Weterynaryjna* 61 (4):4 30-434, ISSN 0025-8628.
- Drochner W., Heckötter E., Scholz H. (1984): Aktuelle Ergebnisse aus der tierärztlichen Fütterungsberatung. 4. Die Zusammensetzung von Grünfütter und Silagen für Wiederkäuer; Untersuchung von Einzelfuttermittel für Wiederkäuer in Problembeständen (ein Erfahrungsbericht). *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 91:61-66. ISSN (printed): 0341-6593.
- Edwards S., Cantley T.C., Day B.N. (1987a): The effects of zearalenone on reproduction in swine. II. The effect on puberty attainment and post-weaning rebreeding performance. *Theriogenology* 28:51-58. ISSN 0093-691X.
- Edwards S., Cantley T.C., Rottinghaus G.E., Osweiler G.D., Day B.N. (1987b): The effects of zearalenone on reproduction in swine. I. The relationship between ingested zearalenone dose and anestrus in non-pregnant, sexually mature gilts. *Theriogenology* 28:43-49. ISSN 0093-691X.
- EFSA (2004): Opinion of the Scientific Panel on Contaminants in the Food Chain on a request from the Commission related to Zearalenone as undesirable substance in animal feed. *The EFSA Journal* 89:1-35. ISBN 92-9199-019-1.
- Etienne M., Dourmad J. Y. (1994): Effects of zearalenone or glucosinolates in the diet on reproduction in sows: A review. *Livestock Production Science* 40:99-13. ISSN 0301-6226.
- Etienne M., Jemmali M. (1982): Effects of zearalenone (F2) on estrous activity and reproduction in gilts. *Journal of Animal Science* 55:1-10. ISSN 0021-8812.
- Fitzpatrick D.W., Picken C.A., Murphy L.C., Buhr M.M. (1989): Measurement of the relative binding affinity of zearalenone, alpha-zearalenol and beta-zearalenol for uterine and oviduct estrogen receptors in swine, rats and chickens: an indicator of estrogenic potencies. *Comp Biochem Physiol C* 94:691-4. ISSN 0472-8413.
- Flowers B., Cantley T., Day B.N. (1987): A comparison of effects of zearalenone and estradiol benzoate on reproductive function during the estrous cycle in gilts. *Journal of Animal Science* 65:1576-84. ISSN 0021-8812.
- Forsell J.H. *et* Pestka J.J. (1985): Relation of 8-ketotrichothecene and zearalenone analog structure to inhibition of mitogen-induced human lymphocyte blastogenesis. *Appl Environ Microbiol* 50:1304-7. ISSN 0099-2240.
- Hagler W.M., Mirocha C.J., Pathre S.V. *et* Behrens J.C. (1979): Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Appl Environ Microbiol* 37:849-53. ISSN 0099-2240.
- Hidy P.H., Baldwin R.S., Greasham R.L., Keith C.L., McMullen J.R. (1977): Zearalenone and some derivatives: production and biological activities. *Adv Appl Microbiol.* 1977; 22:59-82. ISSN 0163-3864.
- Chang K., Kurtz H.J., Mirocha C.J. (1979): Effects of the mycotoxin zearalenone on swine reproduction. *Am J Vet Res* 40:1260-7. ISSN 0002-9645.
- Cheeke P.R. (1998): Mycotoxins in cereal grains and protein supplements. In: *Natural Toxicants in Feeds, Forages and Poisonous Plants*. eds. Cheeke P.R., Intersate Publishers, Inc., 87-136.

- Jesenská Z. (1987): Mikroskopické huby v pozivatinách a v krmivách. Vydavatelstvo Alfa, Bratislava, 319str.
- Jimenez M., Huerta T., Mateo R. (1997): Mycotoxin Production by *Fusarium* Species Isolated from Bananas. *Appl Environ Microbiol* 63:364-369. ISSN 0099-2240.
- Kalač P., Míka V. (1997): Přirozené škodlivé látky v rostlinných krmivech. Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha, 317s. ISBN 80-85120-69-8.
- Kuiper-Goodman T., Scott P.M., Watanabe H. (1987): Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul* 7:253-306. ISSN 0273-2300.
- Kummer V., Faldíková L., Herzig I., Laníková A. (2001): Účinky mykotoxinů na zdraví a reprodukci zvířat, diagnostika a prevence mykotoxikóz. Výzkumný ústav veterinárního lékařství Brno, Brno, 26s.
- Kurtz H.J., Nairn M.E., Nelson G.H., Christensen C.M., Mirocha C.J. (1969): Histologic changes in the genital tracts of swine fed estrogenic mycotoxin. *Am J Vet Res* 30:551-6. ISSN 0002-9645.
- Long G.G., Diekman M., Tuite J.F., Shannon G.M., Vesonder R.F. (1982): Effect of *Fusarium roseum* corn culture containing zearalenone on early pregnancy in swine. *Am J Vet Res* 43:1599-603. ISSN 0002-9645.
- Long G.G., Diekman M.A. (1984): Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. *Journal of Animal Science* 59:1662-70. ISSN 0021-8812.
- Long G.G., Diekman M.A. (1986): Characterization of effects of zearalenone in swine during early pregnancy. *Am J Vet Res* 47:184-7. ISSN 0002-9645.
- Long G.G., Turek J., Diekman M.A. et Scheidt A.B. (1992): Effect of zearalenone on days 7 to 10 post-mating on blastocyst development and endometrial morphology in sows. *Vet Pathol* 29:60-7. ISSN 0300-9858.
- Malekinejad H., Schoevers E. J., Daemen I. J. J. M., Zijistra C., Colenbrander B., Fink-Gremmels J., Roelen B. A. J. (2007): Exposure of oocytes to the *Fusarium* toxins zearalenone and deoxynivalenol causes aneuploidy and abnormal embryo development in pigs. *Biology of reproduction* 77 (5):840-847. ISSN 0006-3363.
- Marks H.L., Bacon C.W. (1976): Influence of *Fusarium*-infected corn and F-2 on laying hens. *Poult Sci* 55:1864-70. ISSN 0032-5791.
- Maryamma K.I., Manomohan C.B., Nair M.G., Ismail P.K., Sreekumaran T., Rajan A. (1992): Pathology of zearalenone toxicosis in chicken and evaluation of zearalenone residues in tissues. *Indian J. Anim. Sci.* 62:105-107. ISSN 0021-8812.
- Migdalof B.H., Dugger H.A., Heider J.G., Coombs R.A., Terry M.K. (1983): Biotransformation of zearalenone: disposition and metabolism in the female rat, rabbit, dog, monkey and man. *Xenobiotica* 13:209-21. ISSN 0049-8254.
- Miller, J.D., Trenholm, H.L. (1994): *Mycotoxins in Grain-Compounds Other Than Aflatoxin*. Eagan Press, St. Paul, Minnesota, USA, 552 pp. ISBN 0-9624407-5-2.
- Mirocha C.J., Harrison J., Nichols A.A. et McClintock M. (1968): Detection of a fungal estrogen (F-2) in hay associated with infertility in dairy cattle. *Appl Microbiol* 16:797-8. ISSN 0003-6919.
- Mirocha C.J., Pathre S.V., Robison T.S. (1981): Comparative metabolism of zearalenone and transmission into bovine milk. *Food Cosmet Toxicol* 19:25-30. ISSN 0015-6264.
- Mueller S.O. (2002): Overview of in vitro tools to assess the estrogenic and antiestrogenic activity of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 777:155-65. ISSN 1570-0232.

- Nešić, K., Resanovic, R., Nešić, V., Sinovec, Z. (2008): Efficacy of mineral and organic adsorbent in alleviating harmful effects of zearalenone on pigs performance and health. *Acta Veterinaria* Vol. 58, No. 2-3, 211-219. ISSN 0567-8315.
- Obremski K., Gajecki M., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Zwierzchowski W., Zielonka L., Mikolajczyk A., Siemionek J. (2005): Clinical case of rabbit zearalenone mycotoxicosis. *Medycyna Weterynaryjna* 61 (4):458-461. ISSN 0025-8628.
- Obremski K., Gajecki M., Zwierzchowski W., Zielonka L., Otrocka-Domagala I., Rotkiewicz T., Mikolajczyk A., Gajecka M., Polak M. (2003): Influence of zearalenone on reproductive system cell proliferation in gilts. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 6 No. 4 239-245. ISSN 1505-1773.
- Obremski, K., Zielonka, L., Gajecka, M., Jakimiuk, E., Bakula, T., Baranowski, M., Gajecki, M. (2008): Histological estimation of the small intestine wall after administration of feed containing deoxynivalenol, T-2 toxin and zearalenone in the pig. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 11, No. 4, 339-345. ISSN 1505-1773.
- Olsen M., Malmlof K., Pettersson H., Sandholm K., Kiessling K.H. (1985): Plasma and urinary levels of zearalenone and alpha-zearalenol in a prepubertal gilt fed zearalenone. *Acta Pharmacol Toxicol (Copenh)* 56:239-43. ISSN 0001-6683.
- Olsen M., Pettersson H., Sandholm K., Visconti A., Kiessling K.H. (1987): Metabolism of zearalenone by sow intestinal mucosa *in vitro*. *Food Chem Toxicology* 25:681-3. ISSN 1873-6351.
- Osweiler G.D. (2000): Mycotoxins contemporary issues of food animal health and productivity. *Veterinary Clinics of North America Food Animal Practice* 16:511-530. ISSN 0749-0720.
- Palyusik M., Harrach B., Mirocha C.J., Pathre S.V. (1980): Transmission of zearalenone and zearalenol into porcine milk. *Acta Vet Acad Sci Hung* 28:217-22. ISSN 0001-6187.
- Palyusik M., Koplík-Kovacs E. (1975): Effect on laying geese of feeds containing the fusariotoxins T2 and F2. *Acta Vet Acad Sci Hung* 25:363-8. ISSN 0001-6187.
- Polak M., Gajecka M., Jakimiuk E., Obremski K., Gajecki M., Smoczynski L., Luczynski M., Góra M., Baranowski M., Zielonka L., Zwierzchowski W. (2004): Metabolic profile of pigs fed feed containing zearalenone destructor. *Polish Journal of Veterinary Sciences* Vol. 7 No. 3 187-191. ISSN 1505-1773.
- Radosz O.M., Blood D.C., Gay C.C., Saunders, W.B. (1997): A textook of the diseases of cattle, sheep, pigs, goats and horses. *Veterinary medicine*. London, 1763. ISBN 07020 26042.
- Rainey M. R., Tubbs R. C., Bennett L. W., Cox N.M. (1990): Prepubertal exposure to dietary zearalenone alters hypothalamo-hypophysial function but does not impair postpubertal reproductive function of gilts. *Journal of Animal Science* 68:2015 – 2022. ISSN 0021-8812.
- Ramos. A.J. , Hernandez E., Pla-Delfina J.M., Merino M. (1996): Intestinal absorption of zearalenone and *in vitro* study of non-nutrive sorbent materials. *Int J Pharm* . 128:129-137. ISSN 1873-3476.
- Ranzenigo, G., Caloni, F., Cremonesi, F., Aad, P. Y., Spicer, L. J. (2008): Effects of *Fusarium* mycotoxins on steroid production by porcine granulosa cells. *Animal Reproduction Science* 107: 115-130. ISSN 0378-4320.
- Scott P.M. (1996): Mycotoxins transmitted into beer from contaminated grains during brewing. *J AOAC Int* 79:875-82 ISSN 1060-3271.
- Sharpe R.M., Skakkebaek N.E. (1993): Are Estrogens Involved in Falling Sperm Counts and Disorders of the Male Reproductive-Tract. *Lancet* 341, 1392-1395. ISSN 0140-6736.

- Shim W.B., Kim J.C., Seo J.A., Lee Y.W. (1997): Natural occurrence of trichothecenes and zearalenone in Korean and imported beers. *Food Addit Contam* 14:1-5. ISSN 0265-203x.
- Smith J.F., di Menna M.E., McGowan L.T. (1990): Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *J Reprod Fertil* 89:99-106. ISSN 0022-4251.
- Speers G.M., Meronuck R.A., Barnes D.M., Mirocha C.J. (1971): Effect of feeding *Fusarium roseum* F. Sp. *graminearum* contaminated corn and the mycotoxin F-2 on the growing chick and laying hen. *Poult Sci* 50:627-33. ISSN 0032-5791.
- Swamy H. V. L. N., Smith T.K., MacDonald E. J., Karrow N.A., Woodward B., Boermans H. J. (2003): Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs, and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbent. *Journal of Animal Science* 81:2792-2803. ISSN 0021-8812.
- Tapiero H., Ba G.N., Tew K.D. (2002): Estrogens and environmental estrogens. *Biomed Pharmacother* 56 (1), 36-44. ISSN 1950-6007.
- Tiemann U., Brussow K.P., Jonas L., Pohland R., Schneider F., Danicke S. (2006): Effects of diets with cereal grains contaminated by graded levels of two *Fusarium* toxins on selected immunological and histological measurements in the spleen of gilts. *Journal of Animal Science* 84 (1):236-245. ISSN 0021-8812.
- Tiemann U., Danicke S. (2007): *In vivo* and *in vitro* effects of the mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol on different non-reproductive and reproductive organs in female pigs: A review. *Food additives and contaminants* 24 (3):306-314. ISSN 0265-203x.
- Vanyi A., Bata A., Glavits R., Kovacs F. (1994): Perinatal oestrogen syndrome in swine. *Acta Vet Hung* 42:433-46. ISSN 0236-6290.
- Wentworth P., Jentz L.A., Croal A.E. (1979): Analysis of sudden unexpected death in southern Ontario, with emphasis on myocarditis. *Can Med Assoc J* 120:676-80, 706. ISSN 0820-3946.
- Whitten P.L., Naftolin F. (1992): Effects of a Phytoestrogen Diet on Estrogen-Dependent Reproductive Processes in Immature Female Rats. *Steroids* 57 (2), 56-61. ISSN 0039-128x.
- Whitten P.L., Russell E., Naftolin F. (1992): Effects of a Normal, Human-Concentration, Phytoestrogen Diet on Rat Uterine Growth. *Steroids* 57 (3), 98-106. ISSN 0039-128x.
- Young L.G., King G.J. (1981): Reproductive performance of gilts bred on first versus third estrus. *Journal of Animal Science* 53:19-25. ISSN 0021-8812.
- Young L.G., King G.J. (1986): Low concentrations of zearalenone in diets of mature gilts. *Journal of Animal Science* 63:1191-6. ISSN 0021-8812.
- Young L.G., King G.J. (1986a): Low concentrations of zearalenone in diets of boars for a prolonged period of time. *Journal of Animal Science* 63:1197-200. ISSN 0021-8812.
- Young L.G., King G.J., McGirr, Sutton J.C. (1982): Moldy corn in diets of gestating and lactating swine. *Journal of Animal Science* 54:976-82. ISSN 0021-8812.
- Young L.G., Ping H., King G.J. (1990): Effects of feeding zearalenone to sows on rebreeding and pregnancy. *Journal of Animal Science* 68:15-20. ISSN 0021-8812.
- Zöllner P., Jodlbauer J., Kleinova M., Kahlbacher H., Kuhn T., Hochsteiner W., Lindner W. (2002): Concentration levels of zearalenone and its metabolites in urine, muscle tissue, and liver samples of pigs fed with mycotoxin-contaminated oats. *J. Agric. Food Chem.* 50:2494-501. ISSN 0021-8561.

- Zwierzchowski W., Obremski K., Zielonka L., Skorska-Wyszynska E., Gajecka M., Jakimiuk E., Polak M., Jana B., Rybarczyk L., Gajecki M. (2006): The impact of zearalenone on the level of the selected estrogens in blood serum of sexually immature gilts. Polish Journal of Veterinar Sciences 9 (4):247-252. ISSN 1505-1773.