

Mykotoksyny jako przyczyna immunosupresji u świń

MARIAN TRUSZCZYŃSKI, ZYGMUNT PEJSAK

Państwowy Instytut Weterynaryjny – Państwowy Instytut Badawczy, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Truszczyński M., Pejsak Z.

Mycotoxins as a cause of immunosuppression in swine

Summary

The paper is a review of publications on immunosuppression caused by mycotoxins contained in feeds consumed by swine. Most mycotoxins are produced by members of 3 genera of fungi: *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium*. Aflatoxin B1 (AFB1), deoxynivalenol (DON) and fumonisin B1 (FB1) were characterized. AFB1 decreases especially the cell-mediated immunity, impairing the response to the vaccine antigen, and modulates cytokine expression. Also, as a consequence of immunosuppression, facultatively pathogenic microorganisms are able to participate in the etiology of multifactorial diseases of swine. Deoxynivalenol (DON) is known to modulate the immune functions of swine, even when applied in relatively small doses. The breakdown of vaccinal immunity, which is low, may lead to infectious diseases against which the swine have been vaccinated, even in cases of highly efficacious vaccines. Immunosuppressive properties were also described in the case of fumonisin B1 (FB1), which – following the consumption of contaminated feed – predisposes swine to the pathological action of *Pasterella multocida*, a facultatively pathogenic strain which does not normally demonstrate pathogenicity. Considering the described immunosuppressive actions of mycotoxins and high losses to swine production caused by these substances, it is recommended to improve the control of feeds for their presence.

Keywords: mycotoxins, swine, immunosuppression

Celem publikacji jest omówienie roli mykotoksyn i mechanizmów ich działania w rozwoju immunosupresji u świń ze skutkiem zwiększenia wrażliwości na wywoływanie choroby przez drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze (zwane też oportunistycznymi) oraz obniżonej odpowiedzi immunologicznej na podawane zwierzętom szczepionki. Artykuł nawiązuje do wcześniejszej publikacji (26), w której podano definicję immunosupresji oraz udział cirkowirusa świń typu 2 (PCV2) i innych drobnoustrojów w jej wywoływaniu u świń. Podkreślono w niej również, że stan ten w głównej mierze sprzyja występowaniu chorób trzody chlewnej o etiologii wieloczynnikowej. Stanowią one obecnie główną przyczynę strat w chowie wielkostatnym. Podobną rolę, jak wywołując immunosupresję drobnoustroje, odgrywają występujące coraz powszechniej, zwłaszcza w paszach, mykotoksyny, co uzasadnia przedstawienie tego zagadnienia.

Charakterystyka mykotoksyn

Mykotoksyny stanowią strukturalnie zróżnicowaną grupę metabolitów o niskiej masie cząsteczkowej. Skażają one około 25% światowej produkcji zbóż (30). Występują zatem dość powszechnie w zawierających pszenicę, jęczmień, kukurydzę, soję paszach dla trzo-

dy chlewnej oraz innych gatunków zwierząt rzeźnych. Są też obecne, chociaż rzadziej, w surowcach i żywności przeznaczonych do konsumpcji dla ludzi. Oprócz wywoływania immunosupresji mykotoksyny są u świń przyczyną zahamowania przyrostów masy ciała (m.c.), wydłużania czasu tuczu oraz nierzadko zaburzeń w rozrodzie (3, 6, 14).

Większość występujących w paszach i żywności mykotoksyn wytwarzają gatunki pleśni rodzajów *Aspergillus*, *Fusarium* i *Penicillium*. Roczne straty związane z ich działaniem sięgają setek milionów dolarów (4).

Aspergillus flavus i *Aspergillus parasiticus* są źródłem aflatoksyn. Wśród nich szczególne znaczenie w patologii człowieka i zwierząt rzeźnych, w tym w wywoływaniu immunosupresji u świń, ma aflatoksyna B1 (AFB1) (19). Występuje ona często w paszach i jest w porównaniu do innych aflatoksyn najbardziej toksyczna. *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum* są źródłem dezoksynivalenolu, mykotoksyny odgrywającej ważną rolę w patologii trzody chlewnej (18). *Fusarium verticillioides* i *Fusarium proliferatum* produkują fumonizynę B1 (FB1), również istotny czynnik chorobotwórczy u trzody chlewnej (9). Bardziej wyczerpujące dane dotyczące ważnych w weterynarii

mykotoksyn i wytwarzających je gatunków pleśni oraz rodzajów zbóż i pasz je zawierających przedstawiają Bouhet i Oswald (4).

Aflatoksyna B1

Aflatoksyny, w szczególności AFB1, działają immunosupresyjnie u świń, zwłaszcza w odniesieniu do odporności komórkowej (3, 12, 14). Efektem ich spożycia przez kilka do kilkunastu tygodni z paszą, jest zwiększona wrażliwość świń na infekcje z udziałem różnych gatunków drobnoustrojów warunkowo chorobotwórczych i częstsze obecnie, jak na wstępie wspomniano, występowanie u trzody chlewnej chorób o etiologii wieloczynnikowej (29). Konsekwencją jest też w wyniku wywołanej przez AFB1 immunosupresji obniżony efekt szczepień profilaktycznych przeciw chorobom zakaźnym (28).

Działaniu AFB1 towarzyszy: obniżenie liczby komórek limfoidalnych, zwłaszcza krążących w organizmie zwierzęcia limfocytów swoiście aktywowanych, hamowanie limfocytoblastogenezy oraz odczynów będących wyrazem nadwrażliwości typu późnego (12). Wymieniona aflatoksyna obniża również cytolizę naturalnych zabójców (natural killers) i szereg funkcji makrofagów, takich jak: aktywność fagocytarna, wewnątrzkomórkowe zabijanie drobnoustrojów lub wytwarzanie utleniających rodników (8). Oddziaływanie AFB1 na odporność humoralną nie jest tak oczywiste jak na odporność komórkową, a ujawnienie się niekorzystnego działania wymaga stosowania wyższych dawek AFB1 (12).

Traktowanie *in vitro* aflatoksyną B1 aktywowanych lipopolisacharydem bakteryjnym (LPS) ludzkich monocytów prowadzi do obniżonej ekspresji i zmniejszonego uwalniania cytokin IL-1 α , IL-6 i TNF- α (10, 19). Analiza *in vitro* stymulowanych mitogenem limfocytów krwi od świń, które wcześniej otrzymywały AFB1, wskazuje na obniżenie wydzielania IL-1 β i zwiększoną ekspresję IL-10 (11).

Z opublikowanej ostatnio przez Meissonniera i wsp. pracy (13), dotyczącej obniżenia przez AFB1 efektu czynnego uodpornienia wynika, że u świń, które otrzymywały przez 28 dni AFB1, odporność komórkowa, swoista dla podawanej parenteralnie owoalbuminy, była niższa w porównaniu do rezultatów od świń, które tej mykotoksyny nie otrzymywały. Wynik ten potwierdza uprzednio wyrażony pogląd, iż AFB1, występująca w podawanych świniom w okresie tuczu paszach, obniża efekt nabywania odporności po stosowaniu szczepionek przeciw chorobom zakaźnym (13). Ze względu na powszechność szczepień ochronnych stwierdzenie to ma dużą wartość praktyczną, wskazując na niezbędność kontroli pasz na obecność AFB1. Efekt supresyjny dotyczy przede wszystkim odporności komórkowej, a jedynie w umiarkowanym stopniu odporności humoralnej (10, 13) i łączy się ze zredukowaną pod wpływem AFB1 aktywacją komórek T w okresie uodporniania (7, 29).

Dezoksyniwalenol

Dezoksyniwalenol, nazywany też womitoksyną – w skrócie DON (18) – występuje na pszenicy, jęczmieniu, kukurydzy. Ostatnie przeglądy 11 022 próbek tych zbóż z 12 państw europejskich wskazywały, że 57% próbek zawierało tę mykotoksynę (21). Głównym celem oddziaływania DON są komórki charakteryzujące się dużą aktywnością mitotyczną, w tym komórki układu odpornościowego (17). Toksyna ta jest oporna na ogrzewanie, zachowuje zatem aktywność w łańcuchu żywnościowym: zwierzęta–człowiek. Świnie są bardzo wrażliwe na DON. Ze względu na spożywanie pasz z dużym dodatkiem zbóż często się z nią stykają (17).

Okazało się, że DON, podobnie jak poprzednio scharakteryzowana AFB1, moduluje u świń, chociaż z uwzględnieniem innego mechanizmu, odpowiedź immunologiczną (20). Zależnie od dawki i częstości ekspozycji działa ona na układ odpornościowy tych zwierząt bądź supresyjnie, bądź pobudzająco. U myszy dodatkowo ekspozycja na wysokie dawki powoduje apoptozę leukocytów (17), co pogłębia immunosupresję. W przeciwieństwie do tego ekspozycja na małe dawki DON skutkuje zwiększoną ekspresją różnych cytokin oraz podwyższeniem IgA i IgG surowicy (16). Z ostatnich badań Vandembroucke i wsp. (27) wynika, że DON obniża u świń poziom odporności wrodzonej, czego efektem jest zwiększona wrażliwość na infekcję wywołaną przez *Salmonella* Typhimurium, co zapewne może dotyczyć również innych serowarów *Salmonella* oraz innych gatunków drobnoustrojów warunkowo chorobotwórczych.

Uzyskane przez Pintona i wsp. (18) wyniki wskazały, że dłużej trwające spożywanie przez świnię zanieczyszczonych dezoksyniwalenolem pasz obniża poszczepienną odpowiedź immunologiczną. Łączy się to ze zmniejszoną produkcją swoistych przeciwciał, niższym występowaniem limfocytów T i zredukowaną ekspresją cytokin w węzłach chłonnych. Okazało się, że DON wywiera po podaniu szczepionki dwustopniowej, różny efekt na proliferację limfocytów. Po 21 dniach po spożyciu skażonej nią paszy u zwierząt, które otrzymały antygen, następuje ich wzrost, a po 35-49 dniach – spadek. W wyniku pomiarów przy użyciu RT-PCR wykazano też spadek cytokin TGF- β i IFN- γ w węzłach krezkowych u świń doświadczalnych w porównaniu do kontrolnych, które nie otrzymały DON. Na tej podstawie oraz badań dodatkowych cytowani autorzy (18) sformułowali pogląd, że występujący w paszach DON, wpływając na obniżenie sprawności układu odpornościowego, stanowi czynnik obniżający efekt odporności poszczepiennej u świń, podobnie jak zostało to wykazane w odniesieniu do AFB1. Mimo zatem stosowania szczepionek o wysokiej skuteczności, poziom odporności poszczepiennej był niezadowolający. Wskazywało na to jej wczesne przełamywanie, licząc od daty szczepień, przez drobnoustroje, przeciw którym świniom uodporniano (18).

Fumonizyna B1

Kolejna mykotoksyna, fumonizyna B1 (FB1), należy do rodziny fumonizyn, które często skażają kukurydzę (1). Występowanie jej wykazano w 50% próbek kukurydzy, zebranych między 1988 i 1991 r. z terenu środkowozachodnich stanów USA. Zależnie od lokalizacji terenu pobierania próbek, w liczbie do 10% wszystkich próbek badanych, stężenie FB1 wynosiło od 10 do 50 ppm. W Wielkiej Brytanii FB1 występowała prawie w każdej próbce kukurydzy, w stężeniach do 32 ppm (22). Wymieniona mykotoksyna indukuje leukoencefalomalację u koni, zaburzenia funkcji nerek u szczurów, królików i jagniąt oraz uszkodzenie wątroby u szeregu gatunków zwierząt (2). Jest rakotwórcza dla gryzoni i człowieka (22). U świń pobieranie z karmą dużych dawek FB1 indukuje obrzęk płuc i obniża przyrosty m.c. (9).

Cytowani autorzy wskazali, że tylko w nielicznych pracach badano wpływ małych dawek FB1 na rozwój stanów zapalnych w płucach świń, z udziałem warunkowo chorobotwórczych szczepów *Pasteurella multocida* (5). W związku z tym postanowiono określić, czy podobnie jak w przypadku wcześniej scharakteryzowanych mykotoksyn, również w przypadku FB1 następuje immunosupresja, umożliwiającą ujawnienie chorobotwórczości przez drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze. Podjęto zatem badania, w trakcie których prosięta otrzymały ekstrakt fumonizyny, w dawce 0,5 mg FB1/kg m.c. dziennie, przez 7 dni. Po kolejnym dniu podano im dotchawicowo hodowlę *Pasteurella multocida*, szczepu warunkowo chorobotwórczego, zachowującego się u zwierząt ze sprawnym systemem odpornościowym jak komensale. W okresie następnych 13 dni określano m.c. prosiąt, częstość kaszlu oraz zawartość komórek w płynie ławazowym z oskrzeli (bronchialveolar lavage fluid, BALF). Po uboju dokonywano w płucach pomiarów zapalnych cytokin. W efekcie, u świń grupy kontrolnej, którym podawano wyłącznie FB1 w małej dawce, nie stwierdzono jej wpływu na przyrosty m.c. Nie obserwowano też objawów klinicznych ani zmian w płucach. Jedynie w BALF wykazano pewną nieznaczną zmienność w składzie komórek. FB1 miała wpływ na zwiększoną ekspresję IL-8, IL-18 i IFN- γ mRNA. Potwierdzono zatem wcześniejsze badania, w których dawka FB1 poniżej 10 ppm nie wywoływała objawów klinicznych i widocznego pogorszenia stanu zdrowia, w tym efektów chowu (10, 22, 23, 31). Natomiast połączenie podanej świniom grupy doświadczalnej FB1 i hodowli *P. multocida* opóźniało wzrost, indukowało kaszel oraz zwiększało zawartość makrofagów i limfocytów w BALF. Zwiększeniu ulegała też, towarzysząca stanom zapalnym, ekspresja TNF- α , IFN- γ i IL-18 mRNA. Reasumując, uzyskane w wyniku badań eksperymentalnych dane wskazały, że również FB1 jest czynnikiem immunosupresyjnym, predysponującym do rozwoju zapalenia płuc u świń. Należy się spodziewać, że pasze zawierające tę mykotoksynę wywie-

rają w warunkach terenowych analogiczny efekt, jak w omówionych doświadczeniach.

W innych pracach okazało się, że resorpcja do organizmu świni FB1 zwiększa kolonizację w przewodzie pokarmowym patogennych szczepów *Escherichia coli* (15) i obniża eliminację *Pseudomonas aeruginosa* po dożylnym zakażeniu (24), co poszerza rolę FB1 również w odniesieniu do patogenyzy biegunek prosiąt przed i po odsadzeniu, czyli schorzeń powszechnie występujących, zwłaszcza w wielkostatnym chowie świń.

Oprócz przedstawionych wyników dotyczących rozwoju chorób świń, wywołanych przez drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze dzięki supresyjnemu działaniu FB1, mykotoksyna ta, jak wynika z badań Taranu i wsp. (25), obniżała również odpowiedź immunologiczną na podawaną szczepionkę. W wyniku trwającej 28 dni ekspozycji odsadzonych prosiąt na zawarte w paszy FB1 ich stopień uodpornienia przeciw antygenom *Mycoplasma agalactiae* był niższy niż u prosiąt grupy kontrolnej, nie otrzymujących tej mykotoksyny. Stwierdzono też pod jej wpływem zmianę profilu cytokin.

Konieczność kontroli pasz na obecność mykotoksyn

Podsumowując stwierdza się co następuje. Przedstawione wyniki badań eksperymentalnych i obserwacji terenowych wskazują, że zawarte w paszach dla świń różne mykotoksyny obniżają sprawność układu odpornościowego (3, 9, 12, 15, 17, 20, 24). Następstwem jest zwiększona zapadalność na schorzenia dróg oddechowych i przewodu pokarmowego, w których uczestniczą drobnoustroje warunkowo chorobotwórcze. Udział mykotoksyn w paszach obniża również przeciwważną odporność poszczepienną. Stwierdzenia te uzasadniają potrzebę udoskonalenia kontroli pasz na obecność mykotoksyn przed uznaniem ich za nadające się do żywienia świń (2) oraz konieczność stosowania preparatów ograniczających możliwości namnażania się pleśni i/lub specyfików wiążących mykotoksyny.

Piśmiennictwo

1. Bezuidenhout S. C., Gelderblom W. C. A., Gorst-Alleman C. P., Horak R. M., Marasas W. F. O., Spiteller G., Vleggaar R.: Structure elucidation of the fumonisin, mycotoxins from *Fusarium moniliforme*. J. Chem. Soc. Chem. Commun. 1988, 743-745.
2. Bolger M., Coker R. D., Dinovi M., Gaylor D., Gelderblom M. O., Paster N., Riley R. T., Shephard G., Speijers J. A.: Safety evaluation of certain mycotoxins in food, [w:] Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Food Additives 2001, 74, 103-279.
3. Bondy G. S., Pestka J. J.: Immunomodulation by fungal toxins. J. Toxicol. Environ. Health B: Crit. Rev. 2000, 3, 109-143.
4. Bouhet S., Oswald I. P.: The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. Vet. Immunol. Immunopathol. 2005, 108, 199-209.
5. Chung W. B., Backstrom L. R., Collins M. T.: Experimental model of swine pneumonic pasteurellosis using crude *Actinobacillus pleuropneumoniae* cytotoxin and *Pasteurella multocida* given endobronchially. Can. J. Vet. Res. 1994, 58, 25-30.
6. Corrier D. E.: Mycotoxicosis: mechanisms of immunosuppression. Vet. Immunol. Immunopathol. 1991, 30, 73-87.

7. *Cysewski S. J., Wood R. L., Pier A. C., Baetz A. L.*: Effects of aflatoxin on the development of acquired immunity to swine erysipelas. *Am. J. Vet. Res.* 1978, 39, 445-448.
8. *Ghosh R. C., Chauhan H. V., Jha G. J.*: Suppression of cell-mediated immunity by purified aflatoxin B1 in broiler chicks. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 1991, 28, 165-172.
9. *Halloy D. J., Gustin P. G., Bouhet S., Oswald I. P.*: Oral exposure to culture material extract containing fumonisins predisposes swine to the development of pneumonitis caused by *Pasteurella multocida*. *Toxicology* 2005, 213, 34-44.
10. *Liu H. H., Yu F. Y., Chan M. H., Yang Y. L.*: The effects of mycotoxins, fumonisin B1 and aflatoxin B1, on primary swine alveolar macrophages. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2002, 180, 197-204.
11. *Marin D. E., Taranu I., Bunaciu P. R., Pascale F., Tudor D. S., Avram N., Sarca M., Cureu I., Criste R. D., Suta V., Oswald I. P.*: Changes in performance, blood parameters, humoral and cellular immune response in weaning piglets exposed to low doses of aflatoxin. *J. Anim. Sci.* 2002, 80, 1250-1257.
12. *Meissonnier G. M., Marin D. E., Galtier P., Bertin G., Oswald I. P.*: Modulation of the immune response by a group of fungal food contaminant, the aflatoxins, [w:] Mengheri E., Roselli M., Britti M. S., Finamore A. (Eds.): *Nutrition and Immunity. Research Signpost, Kerala* 2006, 147-166.
13. *Meissonnier G. M., Pinton P., Laffitte J., Cossalter A.-M., Gong Y. Y., Wild C. P., Bertin G., Galtier P., Oswald I. P.*: Immunotoxicity of aflatoxin B1: Impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 231, 142-149.
14. *Oswald I. P., Coméra C.*: Immunotoxicity of mycotoxins. *Rev. Med. Vet.* 1998, 149, 585-590.
15. *Oswald I. P., Desautels C., Laffitte J., Fournout S., Peres S. Y., Odin M., Le Bars P., Le Bars J., Fairbrother J. M.*: Mycotoxin fumonisin B₁ increases intestinal colonization by pathogenic *Escherichia coli* in pigs. *App. Environ. Microbiol.* 2003, 69, 5870-5874.
16. *Pestka J. J.*: Deoxynivalenol-induced IgA production and IgA nephropathy-aberrant mucosal immune response with systemic repercussions. *Toxicol. Lett.* 2003, 140, 287-296.
17. *Pestka J. J., Zhou H. R., Moon Y., Chung Y. J.*: Cellular and molecular mechanisms for immune modulation by deoxynivalenol and other trichothecenes: unraveling a paradox. *Toxicol. Lett.* 2004, 153, 61-73.
18. *Pinton P., Accensi F., Beauchamps E., Cossalter A.-M., Callu P., Grosjean F., Oswald I. P.*: Ingestion of deoxynivalenol (DON) contaminated feed alters the pig vaccinal immune responses. *Toxicol. Lett.* 2008, 177, 215-222.
19. *Rossano F., Ortega De Luna L., Buommino E., Cusumano V., Losi E., Catania M. R.*: Secondary metabolites of *Aspergillus* exert immunobiological effects on human monocytes. *Res. Microbiol.* 1999, 150, 13-19.
20. *Rotter B. A., Prelusky D. B., Pestka J. J.*: Toxicology of deoxynivalenol (vomitoxin). *J. Toxicol. Environ. Health* 1996, 48, 1-34.
21. *SCOOP*: Collection of occurrence data of Fusarium toxins in food and assessment of dietary intake by the population of EU member states. Directorate-general health and consumer protection. 2003. <http://europa.eu.int/comm/food/fs/scoop/task3210>.
22. *Scudamore K. A., Nawaz S., Hetmanski M. T.*: Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs. II. Determination of mycotoxins in maize and maize products. *Food Addit. Contam.* 1998, 15, 30-55.
23. *Shephard G. S., Thiel P. G., Stockenstrom S., Sydenham E. W.*: Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Inst.* 1996, 79, 671-687.
24. *Smith G. W., Constable P. D., Smith A. R., Bacon C. W., Meredith F. I., Wollenberg G. K., Haschek W. M.*: Effects of fumonisin-containing culture material on pulmonary clearance in swine. *Am. J. Vet. Res.* 1996, 57, 1233-1248.
25. *Taranu I., Marin D. E., Bouhet S., Pascale F., Bailly J.-D., Miller J. D., Pinton P., Oswald I. P.*: Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs. *Toxicol. Sciences* 2005, 84, 301-307.
26. *Truszczyński M., Pejsak Z.*: Immunosupresja jako przyczyna chorób świń o etiologii wieloczynnikowej. *Medycyna Wet.* (w druku).
27. *Vandenbroucke V., Croubels S., Verbrugghe E., Boyen F., De Backer P., Ducatelle R., Rychlik I., Haesebrouck F., Pasmans F.*: The mycotoxin deoxynivalenol promotes uptake of *Salmonella Typhimurium* in porcine macrophages, associated with ERK1/2 induced cytoskeleton. *Vet. Res.* 2009, 40, 64.
28. *Venturini M. C., Perfumo C. J., Risso M. A., Gomez C. M., Piscopo M. V., Sala de Miguel M., Godoy H.*: Effect of aflatoxin B1 on resistance induced by *Bordetella bronchiseptica* vaccine in rabbits. *Vet. Microbiol.* 1990, 25, 209-216.
29. *Venturini M. C., Quiroga M. A., Risso M. A., Lorenzo C. D., Omata Y., Venturini L., Godoy H.*: Mycotoxin T-2 and aflatoxin B1 as immunosuppressors in mice chronically infected with *Toxoplasma gondii*. *J. Comp. Pathol.* 1996, 115, 229-237.
30. *Wiśniewska-Dmytrow H.*: Immunosupresyjne działanie mikotoksyn u drobiu. *Konf. Nauk. nt. Immunosupresja i immunomodulacja układu odpornościowego ptaków – możliwości immunoprofilaktyki. Polanica Zdrój* 2003, s. 46-51.
31. *Zomborszky-Kovacs M., Vetesi F., Horn P., Repa I., Kovacs F.*: Effects of prolonged exposure to low-dose fumonisin B1 in pigs. *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 2002, 49, 197-201.

Adres autora: prof. dr hab. Marian Truszczyński, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy; e-mail: mtruszcz@piwet.pulawy.pl