Zmiany odsetka poszczególnych subpopulacji limfocytów T krwi krezkowej loszek jako konsekwencja niskodawkowej mikotoksykozy zearalenonowo-deoksyniwalenolowej

MICHAŁ DĄBROWSKI, ŁUKASZ ZIELONKA, MIROSŁAW BARANOWSKI,
MAGDALENA GAJĘCKA, ANNA RYKACZEWSKA, MACIEJ T. GAJĘCKI

Katedra Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz, Wydział Medycyny Weterynaryjnej,
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie, ul. Oczapowskiego 13/29, 10-718 Olsztyn

Otrzymano 06.04.2017

Zaakceptowano 17.07.2017

Dąbrowski M., Zielonka Ł., Baranowski M., Gajęcka M., Rykaczewska A., Gajęcki M. T.

Percent changes in mesenteric blood T-lymphocyte subsets in gilts induced by low-dose zearalenone-deoxynivalenol mycotoxin

Summary

Most plant food products and feed ingredients can be contaminated with small doses of fusarial mycotoxins, which cause subclinical changes in humans and animals. The purpose of this study has been to evaluate the effect of low doses of zearalenone (40 µg/kg BW) and deoxynivalenol (12 µg/kg BW) administered daily per os to gilts on T-lymphocyte subpopulations (CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺, CD4⁻CD8⁺) in mesenteric blood during six-week exposure. The experiment was conducted on 36 gilts with an average body weight of 25 ± 2 kg, divided into two groups: experimental (E – which received ZEN + DON) and control (C – which received a placebo). Changes in percentages of particular T-lymphocyte subsets were assessed by flow cytometry. Blood samples were taken at regular weekly intervals from 6 gilts during laparotomy, immediately before the heart's action ceased. The analyses demonstrated that the E group had a transient decrease in the percentage of T-lymphocytes CD4⁺CD8⁺, as well as some disturbance in the linear correlation of growth within the same population of lymphocytes. Mixed low-dose mycotoxin can also be a cause of temporary immunity decline, as well as a factor responsible for disturbances during the maturation of the immune system.

Keywords: zearalenone, deoxynivalenol, mesenteric blood vessels, jejunum, T-lymphocytes, gilts

Środki spożywcze i materiały paszowe pochodzenia roślinnego są bardzo często wektorami niskich dawek mikotoksyn fuzaryjnych (28). Ze względu na szeroki zakres ich zastosowań w przemyśle spożywczym i w produkcji pasz, a także wysoki udział produktów zbożowych w diecie człowieka i zwierząt są ważnym elementem odpowiedzialnym za stan zdrowia ludzi oraz wydajność procesu produkcyjnego zwierząt (10). Najczęściej spotykanymi mikotoksynami fuzaryjnymi są zearalenon (ZEN) oraz deoksyniwalenol (DON).

Zearalenon i jego metabolity powodują zaburzenia w rozrodzie zwierząt, ponieważ w swej aktywności są podobne do estradiolu (40). α -ZEL jest dominującym metabolitem ZEN występującym w organizmie świń, podczas gdy u innych gatunków zwierząt, jak np. u brojlerów, krów i owiec dominującym produktem metabolizmu ZEN jest β -ZEL o dużo mniejszej ak-

tywności metabolicznej (9). Efekt aktywności ZEN zależy od nasilenia i charakteru procesów metabolicznych mających miejsce w organizmie zwierząt (18). Zależy również od statusu immunologicznego (5, 20) układu rozrodczego, który podlega ciągłym zmianom na skutek zmian hormonalnych wynikających z okresu dojrzewania płciowego, etapu cyklu rozrodczego czy ciąży. Wykazano, że ZEN może być immunotoksyczny w niskich stężeniach (33). W odpowiedzi na obecność mikotoksyny, wrażliwe komórki przechodzą wiele zmian w zakresie istotnych procesów metabolicznych (prolifracji i różnicowania się komórek, apoptozy, syntezy cząsteczek biologicznie aktywnych, itp.) (37). Pomimo że badania nad ZEN zostały ostatnio zintensyfikowane, to istnieje niewiele badań nad jego wpływem na barierę jelitową i potencjalnego związku pomiędzy ekspozycją na ZEN a stanami zapalnymi jelit (13).

Deoksyniwalenol jest to jedna z najbardziej znanych i najczęściej opisywanych mikotoksyn fuzaryjnych, co jest związane z wysoką częstotliwością jej występowania w materiałach roślinnych. Drugim powodem dużego zainteresowania świata nauki DON jest fakt wysokiego ryzyka zdrowotnego wobec ludzi i zwierząt (30). Strukturalnie DON jest polarnym związkiem organicznym o wzorze 12, 13-epoksy-3 α , 7 α , trichotech, 15-trihydroksy-9-en-8-on (16). Ketonowa grupa w pozycji C8 jest charakterystyczna dla całej klasy trichotecenów B, w której liczba i położenie grup hydroksylowych i acetylo-estrów może mieć wpływ na potencjalną toksyczność wewnątrz komórek. Poprzez grupę epoksydową, mikotoksyna ta jest w stanie wiązać się z dużą liczbą podjednostek rybosomów eukariotycznych (27) i zakłócać aktywność transferazy peptydowej, pogarszając procesy elongacji, a tym samym powodować skracanie łańcuchów peptydowych. DON z racji możliwości zakłócania syntezy białka, posiada szerokie właściwości toksyczne, np. wpływa na szybkość transportu do komórek (39), metabolizm enzymów w cytoplazmie, zmiany w powinowactwie do aktywnego miejsca wiążącego (30). Z tego powodu wpływa na określone tkanki lub narządy. Czynnikiem determinującym toksyczność DON jest jego dostępność, to znaczy uwolnienie z matrycy i wchłonięcie z jelita (31) do krążenia ogólnoustrojowego, gdzie może być przyczyną określonego odchylenia od norm, np. właściwości morfometrycznych błony śluzowej jelit, wskaźników hematologicznych i biochemicznych surowicy krwi lub efektów produkcyjnych.

Zastanawiając się nad problemem oceny ryzyka w utrzymaniu jakości zdrowotnej środków spożywczych lub pasz (13), trzeba brać pod uwagę również obecność mikotoksyn. Problem ten należy rozwiązywać sytuacyjnie, dobierając odpowiedni tryb działania (35) w wielu płaszczyznach (26). Jednym ze sposobów takiego działania jest dobór odpowiedniego modelu badawczego wykorzystującego świnię jako gatunek najbardziej wrażliwy na obecność mikotoksyn. Istnieje coraz większe zainteresowanie tym modelem badawczym w zakresie badań translacyjnych, co dotyczy również chorób ludzkich. Świnie służą jako użyteczny model do badań patofizjologicznych przewodu pokarmowego. Zwierzęta te okazały się użyteczne do badań podstawowych stanów chorobowych, takich jak: uszkodzenia niedokrwiennie-reperfuzyjne, zaburzenia jelitowe tła stresowego czy zespołu jelita krótkiego (11). Świnie są również bardzo obiecującym gatunkiem w badaniach funkcji bariery jelitowej (12), badaniach biomateriałów czy wykorzystania dodatków paszowych lub spożywczych w celach prewencyjno-terapeutycznych (2).

Istotnym problemem jest wpływ mikotoksyn na stopień aktywności układu immunologicznego miejscowego i ogólnego. Należy to podkreślić, gdyż niejednokrotnie mikotoksyny wykorzystują stany lokalnej immunosupresji w organizmie zwierząt spowodowane

przez inne czynniki (7). Równocześnie same mogą powodować stany supresji, z czego korzystają mikroorganizmy i inne toksyny obecne w przewodzie pokarmowym (32), wprowadzając organizm w stan chorobowy, bez objawów klinicznych typowych dla nisko dawkowych mikotoksykoz. Próbuąc ocenić tego rodzaju sytuację należałoby wykorzystywać badania cytometryczne krwi. Metoda ta pozwala wyodrębnić subtelne zmiany we wzajemnych relacjach poszczególnych subpopulacji komórek immunokompetentnych krwi, co umożliwia również ocenę wzajemnych relacji liczbowych komórek o złożonych immunofenotypach, jakimi są np. różne subpopulacje limfocytów T. Badania wpływu DON i ZEN na limfocyty T CD4⁺8⁺, CD4⁺8⁺ (podwójnie pozytywne – double positive – DP) i CD4⁺8⁺ krwi obwodowej świń wskazują, że mikotoksyny te wywołują zaburzenia fizjologicznego wzrostu liczby komórek DP (3). Z drugiej strony, Ferrari i wsp. (8) wykazali, że DON w dawce 0,5 ppm/świnię nie wywołuje żadnych zmian w zakresie subpopulacji limfocytów T CD3⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁺, CD4⁺CD8⁺. Przytoczone wyniki sugerują również brak wyraźnej korelacji między zmianami w populacji limfocytów T krwi a limfocytów T w narządach nielimfatycznych. Ponadto w dostępnym piśmiennictwie brak jest informacji na temat wpływu ZEN czy DON na populację limfocytów krwi krezkowej. Uwzględniając fakt największego wchłaniania mikotoksyn fuzaryjnych na obszarze jelita cienkiego (15) należy się spodziewać, że we krwi naczyń krezkowych można będzie uzyskać największą koncentrację omawianych związków. Ponadto należy zwrócić uwagę, iż we wspomnianych naczyniach płynie krew, która dopiero zostanie dostarczona do wątroby, czyli centralnego narządu metabolicznego, który odpowiada za procesy detoksykacji.

Przedstawione argumenty, stały się przyczyną podjęcia próby określenia wpływu mieszanej mikotoksykozy niskodawkowej na limfocyty T CD4⁺8⁺, CD4⁺8⁺, CD4⁺8⁺ we krwi pobranej z naczyń krezkowych jelita czczego niedojrzałych płciowo loszek podczas szesćmiesięcznego narażenia *per os*.

Materiał i metody

Wszystkie procedury eksperymentu związane z udziałem zwierząt zostały przeprowadzone z zastosowaniem polskich regulacji prawnych dotyczących doświadczeń na zwierzętach, zgodnie z decyzją Lokalnej Komisji Etycznej w Olsztynie ds. doświadczeń na zwierzętach Nr 88/2009 z 16 grudnia 2009 r.

Zwierzęta. Badanie wykonano na Katedrze Prewencji Weterynaryjnej i Higieny Pasz Wydziału Medycyny Weterynaryjnej Uniwersytetu Warmińsko-Mazurskiego w Olsztynie z użyciem 36 klinicznie zdrowych loszek zakupionych z Gospodarstwa Hodowli Zarodowej Trzody Chlewnej w Dobrzejewicach, będących mieszkańcami ras polskiej białej zwisłouchiej i wielkiej białej polskiej (pbz × wbp). Początkowa średnia masa zwierząt wynosiła około 25 ± 2 kg. Zwierzęta utrzymywano w kojach zbiorowych

ze swobodnym dostępem do wody, żywiono systemem restrykcyjnym w dwóch odpasach: porannym i wieczornym.

Pasza. Pasza stosowana w żywieniu grupy E i C została przebadana na obecność ZEN, α -ZEL i DON. Poziom zanieczyszczenia paszy mikotoksynami został określony za pomocą techniki separacyjnej wykorzystującej kolumnienki powinowactwa immunologicznego (Zearala-Test™ Zearalenone Testing System, G1012, VICAM, Watertown, USA; DON-Test™ DON Testing System, VICAM, Watertown, USA) oraz wysokosprawy chromatograf cieczerwowy (HPLC) (Hewlett Packard, type 1050 and 1100) (41) wyposażony w detektor fluorescencyjny (FLD) oraz diodowy (DAD). Limit oznaczalności dla ZEN wynosił 0,02 $\mu\text{g/g}$ i 0,01 $\mu\text{g/g}$ dla DON.

Odczynniki. ZEN i DON zostały zsyntetyzowane i wystandardyzowane w Katedrze Chemii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Biosyntezę ZEN przeprowadzono na podłożu stanowiącym ziarna ryżu, z wykorzystaniem *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*. Wyszuszone i zmielone ziarno poddano odfłuszczeniu heksanem. Z powodu przechodzenia niewielkich ilości mikotoksyny do warstwy organicznej ekstrahowano ją alkoholem etylowym. Z odfłuszczonego materiału, po zakwaszeniu do pH = 3 wykonano kilkukrotną ekstrakcję ZEN chloroformem, przy każdorazowym zagęszczaniu frakcji chloroformowej prawie do sucha. Zagęszczone warstwy chloroformowe połączono z warstwami alkoholowymi, odparowano do sucha i rozpuszczono w 300 ml wody. ZEN z warstwy wodnej ekstrahowano benzenem, a następnie odparowano do sucha. Do oczyszczania ZEN zastosowano kolumnę chromatograficzną z wypełnieniem z Kieselgelu. Metabolity wmywano z kolumny mieszaniną rozpuszczalników benzen : aceton w stosunku 9 : 1, a następnie całość odparowano do sucha i rozpuszczono w etanolu. Frakcję alkoholową oczyszczano kilkakrotnie heptanem. Po zagęszczeniu tej frakcji izolowano z niej alkoholem ZEN. Stopień oczyszczenia otrzymanej mikotoksyny sprawdzono spektroskopowo. Był on porównywalny z parametrami standardu ZEN firmy Sigma-Aldrich.

Biosynteza DON została przeprowadzona z wykorzystaniem *Fusarium graminearum* i *Fusarium culmorum*. Podłożem do biosyntezy DON były ziarna ryżu. Po 4-tygodniowej inkubacji wysuszone i zmielone ziarno poddano ekstrakcji mieszaniną metanol : woda w stosunku 3 : 1. DON ekstrahowano metodą ekstrakcji podziałowej cieczerw-ciecz octanem etylu i po odparowaniu do sucha rozpuszczano w chloroformie. Po wysuszeniu i zawieszeniu badanej próbki w octanie etylu była ona nanoszona na kolumnę wypełnioną mieszaniną węgla aktywnego i Kieselgelu. DON wmywano z kolumny octanem etylu, a jego zawartość w poszczególnych frakcjach określono metodą wysokosprawnej chromatografii cieczerwowej (HPLC).

Otrzymane mikotoksyny zostały rozpuszczone w 500 ml alkoholu etylowego (96% alkohol etylowy, SWW2442-90, Polskie Odczynniki Chemiczne SA). Powstałe roztwory przenoszono do żelatynowych kapsułek w ilości zapewniającej uzyskanie dawki 40 $\mu\text{g/kg}$ mc dla ZEN i 12 $\mu\text{g/kg}$ mc dla DON. Tak przygotowane kapsułki inkubowano przez 12 godzin w temperaturze pokojowej bez dostępu światła celem odparowania rozpuszczalnika.

Procedura eksperymentu. Zwierzęta zostały losowo podzielone na dwie grupy (E = ZEN 40 $\mu\text{g/kg}$ BW + DON 12 $\mu\text{g/kg}$ BW; n = 18) oraz grupę kontrolną (C, n = 18). Grupa kontrolna (C) otrzymywała *per os* placebo. Placebo stanowiła żelatynowa kapsułka wypełniona tylko nośnikiem, na który w grupie E dodatkowo nanoszono mikotoksyny. Badane mikotoksyny i placebo podawane były codziennie w żelatynowych kapsułkach bezpośrednio przed porannym karmieniem. Doświadczenie prowadzono przez 6 tygodni (42 dni). Co tydzień zwierzęta z każdej grupy ważono. Wyliczona średnia masa ciała stanowiła podstawę do określenia dawki toksyny stosowanej w okresie poprzedzającym następnę ważenie.

Krew. Próbkę krwi pobierano w 7., 14., 21., 28., 35. i 42. dniu doświadczenia od trzech losowo wybranych zwierząt z obu grup (E i C). Krew kreskową pobierano z odsłoniętej operacyjnie żyły kreskowej doczaszkowej (*vena mesenterica cranialis*) do polipropylenowych probówek z napylnym antykoagulantem EDTA:K3 (Sarstedt, Niemcy), od zwierząt znajdujących się w stanie znieczulenia ogólnego wywołanego thiopentalem sodu.

Oznaczenie odsetka subpopulacji limfocytów T. 50 μl pobranej krwi przenoszono do probówek cytometrycznych. Do próbek krwi dodawano przeciwciała monoklonalne w objętości zalecanej przez producenta, Mouse Anti Pig (AbD Serotec, UK) swoiste w stosunku do powierzchniowych receptorów CD4 (CD4a:FITC, klon MIL17) oraz CD8 (CD8a:PE, klon MIL-12) limfocytów T. Próbkę krwi inkubowano przez 30 min. w lodzie. Po inkubacji krwinki czerwone poddawano lizie przy użyciu lizatu FACS Lysing solution (BD, USA). Erytrocyty lizowano przez 12 min w temperaturze pokojowej bez dostępu światła. Pozostałe komórki przepłukano PBS i wirowano przy 300 $\times$ G przez 5 min w temperaturze pokojowej. Akwizycji danych dokonano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto II (BD, USA) nagrywając dla każdej próbki 30 000 zdarzeń, a analizę immunofenotypu limfocytów w środowisku przeprowadzono z zastosowaniem programu FACSDiva Software 6.1.3 (BD, USA).

Analiza statystyczna. Wyniki zmiany odsetka subpopulacji limfocytów CD4⁺CD8⁻, CD4⁺CD8⁺ i CD4⁺CD8⁺ w krwi loszek przedstawiono podając wartość średnią ($\bar{x}$) i odchylenie standardowe (SD) dla każdej grupy w poszczególnych tygodniach eksperymentu. Do analizy danych wykorzystano program Statistica (StatSoft Inc, USA). Otrzymane średnie porównywano przy pomocy jednoczynnikowej analizy wariancji dla układów z powtarzalnymi pomiarami ze względu na zastosowaną dawkę ZEN i DON oraz okres jego podawania. Założenie o równości wariancji w porównywanych grupach (wymagane przy stosowaniu analizy wariancji) sprawdzono, stosując test jednorodności Browna-Forsythe'a. Do wyodrębnienia różnic między poszczególnymi grupami użyto testu post-hock Tukeya rozsądnej istotnej różnicy (RIR) ($p \leq 0,05$ lub $p \leq 0,01$).

W celu stwierdzenia liniowej zależności pomiędzy wiekiem a poziomem poszczególnych subpopulacji limfocytów zastosowano analizę korelacji r-Pearsona. Analiza została przeprowadzona z wykorzystaniem programu Statistica (StatSoft Inc, USA). Za wynik statystycznie istotny przyjęto wartość $p \leq 0,05$.

Ryc. 1. Zmiany odsetka poszczególnych populacji limfocytów w czasie sześciotygodniowego narażenia

Wyniki i omówienie

Pasza eksperymentalna. Zawartość ZEN, α -ZOL i DON w paszy stosowanej w żywieniu grupy E i C nie przekroczyły wartości LOD zastosowanej metody analitycznej.

Procentowy udział subpopulacji limfocytów w próbkach krwi z żyły kręzkowej doczaszkowej. Przez cały okres doświadczenia udział każdej z poszczególnych subpopulacji limfocytów T (CD4⁺8⁻, CD4⁺8⁺ oraz CD4⁻8⁺) w określonych terminach narażenia był bardzo podobny. Jedynie w V tygodniu narażenia stwierdzono istotne różnice ($P \leq 0,01$) w odsetkowym udziale limfocytów T CD4⁺8⁺ pomiędzy grupą C a grupą E (ryc. 1). Ponadto w trakcie trwania eksperymentu stwierdzono w grupie C istotną korelację wzrostu odsetka komórek DP w stosunku do czasu eksperymentu ($P = 0,035$). W grupie E nie stwierdzono istotnej korelacji wzrostowej wymienionych populacji limfocytów (ryc. 2). W pozostałych terminach i grupach nie stwierdzono istotnych różnic w zakresie zmiany odsetka poszczególnych populacji limfocytów, jak również nie stwierdzono występowania istotnych korelacji czasowych.

Błona śluzowa jelit jest kluczową strukturą odpowiedzialną za wchłanianie mikotoksyn podczas narażenia drogą *per os*. Nabłonek powierzchniowy przewodu pokarmowego narażony jest na najwyższą koncentrację mikotoksyn jak również odpowiada za absorpcję mikotoksyn ze światła jelita do krążenia ogólnoustrojowego (34). Wysoka koncentracja mikotoksyn w świetle przewodu pokarmowe-

go, a zwłaszcza w obrębie jelit cienkich może być przyczyną groźnych dla zdrowia stanów zapalnych. W trakcie procesu zapalnego dochodzi do zwiększonej migracji komórek układu białokrwinkowego z łożyska

Ryc. 2. Charakterystyka korelacji odsetka limfocytów CD4⁺8⁺ w porównaniu do okresu narażenia w grupie kontrolnej (A) i w grupie eksperymentalnej (B)

naczyniowego do tkanek objętych procesem patologicznym (24, 25). W badaniach dotyczących wpływu stanu zapalnego na naczynia błony śluzowej stwierdzono poszerzenie przestrzeni pomiędzy komórkami endotelialnymi, jak również zwiększoną adherencję leukocytów, erytrocytów i płytek krwi do śródbłonna (21). W badaniach angiograficznych obrazujących zmiany w naczyniach jelitowych podczas wrzodziejącego zapalenia jelita grubego (UC – ulcerative colitis) stwierdzono też poszerzenie światła naczyń oraz ich nieregularny przebieg (2). Należy również zwrócić uwagę na oddziaływanie samej mikotoksyny na naczynia krwionośne. W badaniach przeprowadzonych na ludzkich komórkach endotelialnych żyły pępowinowej stwierdzono, że DON może powodować zatrzymanie cyklu komórkowego podczas przejścia z fazy G2 do M. DON może również indukować zwiększoną ekspresję genów kodujących kaspazę-3 i -9 oraz Bax, co prowadzi do nasilonej apoptozy tych komórek, a tym samym przyczynia się do zwiększonej przepuszczalności naczyń (4).

Celem niniejszych badań była ocena zdolności niskich dawek ZEN i DON podawanych w mieszance paszowej do wywoływania miejscowej dysproporcji odsetkowej liczby limfocytów CD4⁺8⁻, CD4⁺8⁺ i CD4⁻8⁺ w krwi krezkowej. Należy zwrócić uwagę, iż żyła krezkowa doczaszkowa odprowadza krew z obszaru jelit cienkich, czyli miejsca narażonego na najwyższą koncentrację mikotoksyn, które mogą indukować nasiloną apoptozę wybranych komórek immunokompetentnych.

Przeprowadzone badania wykazały, że niskie dawki równocześnie podawanych mikotoksyn (ZEN + DON) powodują przejściowy spadek limfocytów CD4⁺8⁺ w piątym tygodniu narażenia. Ponadto wykazano, że podawane mikotoksyny powodują zaburzenie liniowego wzrostu komórek DP, co może wskazywać na upośledzenie procesów związanych z maturacją układu immunologicznego. Otrzymany wynik nie różni się od wcześniej przedstawionych rezultatów i stanowi potwierdzenie wcześniejszych danych charakteryzujących stan układu immunologicznego na poziomie ogólnoustrojowym (3). Należy jednak zwrócić uwagę, że w badaniach przeprowadzonych na tym samym modelu badawczym wykazano wpływ intoksykacji mieszanej na liczne zmiany histopatologiczne w obrębie jelita czczego. Stwierdzono wzrost liczby limfocytów w nabłonku i blaszce właściwej błony śluzowej w szóstym tygodniu narażenia (33). Wyniki te wskazują, że zastosowane dawki mogą wywoływać zmiany o charakterze proliferacyjnym, a tym samym sugerują wysoki potencjał immunomodulacyjny w ujęciu lokalnej odpowiedzi immunologicznej.

Dostępne piśmiennictwo dotyczące wpływu DON i w mniejszym stopniu ZEN wyraźnie podkreśla niekorzystny wpływ obu substancji na morfologię i funkcję przewodu pokarmowego. W badaniach przeprowa-

dzonych na linii komórek nabłonkowych świni IPEC-1 wykazano, że DON powoduje obniżenie elektrycznego potencjału transbłonowego (TEER), obniża ekspresję kładyny-3 i -4 wchodzących w skład połączeń ścisłych, powoduje wzrost przepuszczalności dekstranu o masie cząsteczkowej 4 kDa, jak również ułatwia translokację bakterii *E. coli* 28C (29). Ponadto DON ma zdolność modyfikowania produkcji cytokin w komórkach nabłonkowych jelit. W badaniach przeprowadzonych przez Wan i wsp. (38) wykazano zdolność tej mikotoksyny do indukcji ekspresji IL-1a, IL-1b, IL-6, IL-8, TNF- α oraz MCP1. Szczególnie istotną z punktu widzenia indukcji stanów zapalnych wydaje się IL-8. Stanowi ona wczesny marker zapalenia i jest chemokiną wywołującą migrację leukocytów i limfocytów T. Nasila proliferację komórek oraz kontroluje procesy naprawcze powstałe na skutek urazów lub oddziaływania czynników cytotoksycznych (14). Należy jednak zwrócić uwagę na badania Moon i wsp. (23). Wykazali oni, że inkubacja ludzkich komórek nabłonkowych z LPS obniża ich zdolność do indukowanej DON produkcji IL-8. Zjawisko to jest związane z indukcją za pośrednictwem LPS zwiększonej liczby receptorów aktywowanych przez proliferatory peroksysomów- γ (PPAR- γ – peroxisome proliferator-activated receptors- γ) (30). Aktywowany PPAR- γ powoduje inhibicję czynników transkrypcyjnych, takich jak STAT, AP-1 oraz NF- κ B, a tym samym oddziałuje przeciwzapalnie (36). Należy również zwrócić uwagę na enteropatogenne oddziaływanie ZEN. Mikotoksyna ta wiązana jest przede wszystkim z niekorzystnym oddziaływaniem na układ rozrodczy (22), ale może również działać immuno-, hepato- i nefro-toksycznie oraz powodować nasiloną peroksydację lipidów (19). W badaniach przeprowadzonych nad wpływem ZEN na komórki linii IPEC-1 wykazano, że mikotoksyna ta może powodować wprost proporcjonalny do dawki spadek żywotności komórek, jak również obniżać TEER. W tych samych badaniach stwierdzono, że ZEN może być czynnikiem indukującym zwiększoną syntezę IL-8 i IL-10 (17).

Pomimo braku różnic w zakresie odsetka limfocytów CD4⁺8⁻, CD4⁺8⁺ i CD4⁻8⁺ pomiędzy krwią pobraną z żyły krezkowej doczaszkowej a krążeniem obwodowym, nie można jednoznacznie stwierdzić, że obie badane mikotoksyny są obojętne w stosunku do przewodu pokarmowego. Jelita są środowiskiem bytowania bakterii symbiotycznych, stanowiących naturalne źródło LPS, który wchodzi w interakcje z enterocytami. Zjawisko to może powodować zwiększoną ekspresję PPAR- γ , który ogranicza pozapalne właściwości ZEN i DON. Z drugiej strony, należy zwrócić uwagę na fenotyp badanych komórek. Przedstawione wyniki opierają się na klasycznym immunofenotypowaniu limfocytów, dzielącym tę populację na komórki pomocnicze, cytotoksyczne i pobudzone komórki pamięci. Przedstawiony wynik sugeruje, iż są to komórki

odporne na niskodawkową intoksykację i stanowią słaby marker lokalnego stanu patologicznego. Należy jednak podkreślić, że badane populacje, a zwłaszcza komórki CD4⁺8⁺ krwi obwodowej mogą być dobrym wskaźnikiem diagnostycznym narażenia niskodawkowego na DON i ZEN w ujęciu ogólnoustrojowym.

Piśmiennictwo

1. Cavagnaro J., Lima B. S.: Regulatory acceptance of animal models of disease to support clinical trials of medicines and advanced therapy medicinal products. *Eur. J. Pharmacol.* 2015, 759, 51-62.
2. Chidlow J. H., Shukla D., Grisham M. B., Kevil C. G.: Pathogenic angiogenesis in IBD and experimental colitis: new ideas and therapeutic avenues. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2007, 293, G5-G18.
3. Dąbrowski M., Obremski K., Gałęcka M., Gałęcki M. T., Zielonka Ł.: Changes in the Subpopulations of Porcine Peripheral Blood Lymphocytes Induced by Exposure to Low Doses of Zearalenone (ZEN) and Deoxynivalenol (DON). *Molecules* 2016, 21, 557.
4. Deng C., Ji C., Qin W., Cao X., Zhong J., Li Y., Srinivas S., Feng Y., Deng X.: Deoxynivalenol inhibits proliferation and induces apoptosis in human umbilical vein endothelial cells. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2016, 43, 232-241.
5. Dunbar B., Patel M., Fahey J., Wira C.: Endocrine control of mucosal immunity in the female reproductive tract: Impact of environmental disruptors. *Mol. Cell. Endocrinol.* 2012, 354, 85-93.
6. Embry M. R., Bachman A. N., Bell D. R., Boobis A. R., Cohen S. M., Dellarco M., Dewhurst I. C., Doerrner N. G., Hines R. N., Moretto A., Phillips R. D., Rowlands J. C., Tanir J. Y., Wolf D. C., Boobis A. R.: Risk assessment in the 21st century: Roadmap and matrix. *Crit. Rev. Toxicol.* 2014, 44, 6-16.
7. Escrivá L., Font G., Manys L.: In vivo toxicity studies of fusarium mycotoxins in the last decade: A review. *Food Chem. Toxicol.* 2015, 78, 185-206.
8. Ferrari L., Cantoni A. M., Borghetti P., De Angelis E., Corradi A.: Cellular immune response and immunotoxicity induced by DON (deoxynivalenol) in piglets. *Vet. Res. Commun.* 2009, 33, 133-135.
9. Gałęcka M., Zielonka Ł., Dąbrowski M., Mróz M., Gałęcki M.: The effect of low doses of zearalenone and its metabolites on progesterone and 17 β -estradiol concentrations in blood and body weights of pre-pubertal female Beagle dogs. *Toxicol.* 2013, 76, 260-269.
10. Gałęcka M., Zielonka Ł., Gałęcki M.: Activity of zearalenone in the porcine intestinal tract. *Molecules* 2017, 22, 18.
11. Gonzalez L. M., Moeser A. J., Bliklager A. T.: Porcine models of digestive disease: the future of large animal translational research. *Translational Res.* 2015, 166, 12-27.
12. Graham M. L., Schuurman H. J.: Validity of animal models of type 1 diabetes, and strategies to enhance their utility in translational research. *Eur. J. Pharmacol.* 2015, 759, 221-230.
13. Joa H., Konga C., Song M., Kim B. G.: Effects of dietary deoxynivalenol and zearalenone on apparent ileal digestibility of amino acids in growing pigs. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2016, 219, 77-82.
14. Maheshwari A., Lacson A., Lu W., Fox S., Barleycorn A., Christensen R., Calhoun D.: Interleukin 8/CXCL8 forms an autocrine loop in fetal intestinal mucosa. *Pediatr. Res.* 2004, 56, 240-249.
15. Maresca M.: From the Gut to the Brain: Journey and Pathophysiological Effects of the Food-Associated Trichothecene Mycotoxin Deoxynivalenol. *Toxins* 2013, 5, 784-820.
16. Maresca M., Fantini J.: Some food-associated mycotoxins as potential risk factors in humans predisposed to chronic intestinal inflammatory diseases. *Toxicol.* 2010, 56, 282-294.
17. Marin D. E., Motiu M., Taranu I.: Food Contaminant Zearalenone and Its Metabolites Affect Cytokine Synthesis and Intestinal Epithelial Integrity of Porcine Cells. *Toxins (Basel)* 2015, 6, 1979-1988.
18. Marin D. E., Pistol G. C., Neagoe I. V., Calin L., Taranu I.: Effects of zearalenone on oxidative stress and inflammation in weanling piglets. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 58, 408-415.
19. Marin D. E., Taranu I., Burlacu R., Manda G., Motiu M., Neagoe I., Dragomir C., Stancu M., Calin L.: Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. *Toxicol. In Vitro* 2011, 8, 1981-1988.
20. Martin L. M., Wood K. M., McEwen P. L., Smith T. K., Mandell I. B., Yannikouris A., Swanson K. C.: Effects of feeding corn naturally contaminated with Fusarium mycotoxins and/or a modified yeast cell wall extract on the performance, immunity and carcass characteristics of grain-fed veal calves. *Anim. Feed Sci. Tech.* 2010, 159, 27-34.
21. McDonald D. M.: Neurogenic inflammation in the rat trachea. I. Changes in venules, leucocytes and epithelial cells. *J. Neurocytol.* 1988, 17, 583-603.
22. Minervini F., Dell'Aquila M. E.: Zearalenone and Reproductive Function in Farm Animals. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, 9, 2570-2584.
23. Moon Y., Yang H., Park S. H.: Hypo-Responsiveness of Interleukin-8 Production in Human Embryonic Epithelial Intestine 407 Cells Independent of NF-kappaB Pathway: New Lessons From Endotoxin and Ribotoxic Deoxynivalenol. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2008, 231, 94-102.
24. Muller W. A.: Getting Leukocytes to the Site of Inflammation. *Vet. Pathol.* 2013, 50, 7-22.
25. Muller W. A.: Leukocyte-endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response. *Trends Immunol.* 2003, 24, 327-334.
26. Pastoor T. P., Bachman A. N., Bell D. R., Cohen S. M., Dellarco M., Dewhurst I. C., Doe J. E., Doerrner N. G., Embry M. R., Hines R. N., Moretto A., Phillips R. D., Rowlands J. C., Tanir J. Y., Wilki D. C., Boobis A. R.: A 21st century roadmap for human health risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.* 2014, 44, 1-5.
27. Pestka J. J.: Deoxynivalenol: Mechanisms of action, human exposure, and toxicological relevance. *Archiv Toxicol.* 2010, 84, 663-679.
28. Pinton P., Accensi F., Beauchamp 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.
29. Pinton P., Nougayrède J. P., Del Rio J. C., Moreno C., Marin D. E., Ferrier L., Bracarense A. P., Kolf-Clauw M., Oswald I. P.: The food contaminant deoxynivalenol, decreases intestinal barrier permeability and reduces claudin expression. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2009, 15, 41-48.
30. Pinton P., Oswald I. P.: Effect of Deoxynivalenol and Other Type B Trichothecenes on the Intestine: A Review. *Toxins* 2014, 6, 1615-1643.
31. Pinton P., Tsybulsky D., Lucio J., Laffitte J., Cllu P., Lyazhri F., Grosjean F., Bracarense A. P., Kolf-Clauw M., Oswald I. P.: Toxicity of Deoxynivalenol and Its Acetylated Derivatives on the Intestine: Differential Effects on Morphology, Barrier Function, Tight Junction Proteins, and Mitogen-Activated Protein Kinases. *Toxicol. Sci.* 2012, 130, 180-190.
32. Piotrowska M., Śliżewska K., Nowak A., Zielonka Ł., Żakowska Z., Gałęcka M., Gałęcki M.: The effect of experimental Fusarium mycotoxicosis on microbiota diversity in porcine ascending colon contents. *Toxins* 2014, 6, 2064-2081.
33. Przybylska-Gornowicz B., Tarasiuk M., Lewczuk B., Prusik M., Ziolkowska N., Zielonka Ł., Gałęcki M., Gałęcka M.: The Effects of Low Doses of Two Fusarium Toxins, Zearalenone and Deoxynivalenol, on the Pig Jejunum. A Light and Electron Microscopic Study. *Toxins* 2015, 7, 4684-4705.
34. Sergeant T., Parys M., Garsou S., Pussemier L., Schneider Y. J., Larondelle Y.: Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. *Toxicol. Lett.* 2006, 164, 167-176.
35. Simon T. W., Simons S. S. Jr., Preston R. J., Boobis A. R., Cohen S. M., Doerrner N. G., Fenner-Crisp P. A., McMullin T. S., McQueen C. A., Rowlands J. C.: RISK 21 Dose-Response Subteam: The use of mode of action information in risk assessment: Quantitative key events/dose-response framework for modeling the dose-response for key events. *Crit. Rev. Toxicol.* 2014, 44, 17-43.
36. Sokołowska M., Kowalski M. L., Pawliczak R.: Peroxisome proliferator-activated receptors-g (PPAR-g) and their role in immunoregulation and inflammation control. *Postepy Hig. Med. Dosw.* 2005, 59, 472-484.
37. Taranu I., Braicu C., Marin D. E., Pistol G. C., Motiu M., Balacescu L., Neagoe I. B., Burlacu R.: Exposure to zearalenone mycotoxin alters in vitro porcine intestinal epithelial cells by differential gene expression. *Toxicol. Lett.* 2015, 232, 310-325.
38. Wan L. Y., Turner P. C., El-Nezami H.: Individual and combined cytotoxic effects of Fusarium toxins (deoxynivalenol, nivalenol, zearalenone and fumonisins B1) on swine jejunal epithelial cells. *Food Chem. Toxicol.* 2013, 57, 276-283.
39. Waśkiewicz A., Beszterda M., Kostecki M., Zielonka Ł., Goliński P., Gałęcki M.: Deoxynivalenol in the gastrointestinal tract of immature gilts under per os toxin application. *Toxins* 2014, 6, 973-987.
40. Wielogórska E., Elliott C. T., Danaher M., Connolly L.: Validation and application of a reporter gene assay for the determination of estrogenic endocrine disruptor activity in milk. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 69, 260-266.
41. Zwierzchowski W., Gałęcki M., Obremski K., Zielonka Ł., Baranowski M.: The occurrence of zearalenone and its derivatives in standard and therapeutic feeds for companion animals. *Pol. J. Vet. Sci.* 2004, 7, 289-293.

Adres autora: dr hab. Łukasz Zielonka, ul. Oczapowskiego 13, 10-718 Olsztyn; e-mail: lukasz@uwm.edu.pl