

Test transformacji blastycznej limfocytów w ocenie wpływu ochratoksyny A na układ odpornościowy kur i ich potomstwa

MAGDALENA ZALESKA, ARTUR ŻBIKOWSKI, JAN NIEMIEC*, GRAŻYNA KOSOWSKA

Zakład Chorób Ptaków, Katedra Patologii i Diagnostyki Weterynaryjnej Wydziału Medycyny Weterynaryjnej,
*Zakład Hodowli Drobiu Wydziału Nauk o Zwierzętach SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Zaleska M., Żbikowski A., Niemiec J., Kosowska G.

Lymphocyte blastic transformation test in the evaluation of ochratoxin A influence on the immune system of hens and their progeny

Summary

Ochratoxin A (OA) is the most important mycotoxin causing contamination of feed and food. In addition to strong nephrotoxicity, OA also affects the immune system. Using a test of the blastic transformation of lymphocytes (TBTL) the impact of OA on the proliferative capacity of peripheral blood lymphocytes in laying hens and their offspring has been evaluated.

In the first experiment the authors evaluated the influence of feeding hens for 14 days on feed containing 0.5 ppm of ochratoxin A. Blood samples were collected at day 14 of the experiment. The studies to determine the effect of ochratoxin on the proliferative capacity of lymphocytes in the offspring of hens fed a diet containing the mycotoxins were performed in three groups of broiler breeders. Birds received a mix containing 0.5 ppm of OA for 4 weeks. The collection of eggs for hatching was started after 7 days of feeding hens with feed contaminated by OA. Two test hatchings were conducted. Hatched chicks were reared under standard conditions. At 14, 21, 35 and 49 days of rearing chickens were bled for testing TBTL. The authors have shown a suppressive effect of ochratoxin A contained in the feed given to hens on the proliferating ability of lymphocytes (mean IS in treatment and control groups were, respectively, 7.30 and 9.41). The study shows that OA in feed given to hens also reduced the stimulation index of peripheral blood lymphocytes in their offspring.

Keywords: ochratoxin A, feed, hens, offspring, test of blastic transformation of lymphocytes

Ochratoksykozy należą do najbardziej niebezpiecznych i jednocześnie najczęściej występujących w Polsce mikotoksykoz drobiu (6). Najważniejszą wykrywaną w zbożach mikotoksyną jest ochratoksyna A (OA). Jednym z następstw jej działania jest zakłócenie odpowiedzi immunologicznej (7). Ochratoksyna A powoduje uszkodzenie układu limfatycznego drobiu, zmniejsza liczbę i aktywność limfocytów T i B oraz obniża odporność komórkową i humoralną (12, 13).

Powszechnie przyjmuje się, że spośród wielu metod określających status immunologiczny organizmu jedną z najbardziej wartościowych jest test transformacji blastycznej limfocytów (TTBL), który jest dobrym wskaźnikiem oceny aktywności limfocytów T lub B. Zasada działania testu polega na pomiarze w warunkach *in vitro* zdolności limfocytów do odpowiedzi na podany antygen. W badaniach wykorzystuje się

zarówno antygeny swoiste (np. określony patogen), jak i nieswoiste. W przypadku tych ostatnich najczęściej stosuje się mitogeny pochodzenia roślinnego – lektyny zawarte w wyciągach z fasoli (fitohemaglutynina, PHA), konwalii (konkanawalina A, Con A) i szkarłatki (pokeweed mitogen, PWM) (14).

Po stymulacji PHA liczba komórek w hodowlach początkowo zmniejsza się, a następnie wzrasta na skutek zwiększonej intensywności podziałów komórkowych. Po zastosowaniu swoistych antygenów silniejszej proliferacji powinny ulegać limfocyty pochodzące od osobników uczulonych na dany antygen (wirusowy, bakteryjny, chemiczny). Obecnie najczęściej stosowaną metodą oznaczania stopnia proliferacji limfocytów jest analiza ilościowa inkorporacji znakowanej trytem tymidyny przez nowo powstałe komórki (10).

TTBL znalazł największe zastosowanie w immunologii infekcyjnej kur, jako metoda do oceny odporności komórkowej w przebiegu chorób immunosupresyjnych. Między innymi obniżenie reaktywności limfocytów w TTBL po stymulacji PHA obserwowano po zakażeniu *in vivo* i *in vitro* wirusem choroby Mareka (15), wirusem mieloblastozy (16), retikuloendoteliozy (8), mięsaka Rousa (17), wirusem choroby Gumboro (9) bądź wirusem zakaźnej anemii kurcząt (1).

Celem pracy była standaryzacja testu transformacji blastycznej limfocytów krwi, a następnie jego użycie do określenia wpływu ochratoksyny A na układ odpornościowy kur niosek i ich potomstwa.

Materiał i metody

Standaryzacja testu transformacji blastycznej limfocytów krwi obwodowej kur niosek. Krew do badań pobrano od 10 zdrowych kur niosek linii Cobb 500 w wieku 32 tygodni, którą nawarstwiano na jałowy roztwór Gradisolu (Polfa Kutno, Polska) o różnej gęstości (1,075; 1,077; 1,081) i wirowano przy 450 g przez 30 min. (2, 3).

Po zakończeniu wirowania zbierano komórki interfazy, które trzykrotnie płukano w płynie Eagle'a wzbogaconym o L-glutaminę (1%) i gentamycynę (0,1%), wirując za każdym razem przy 150 g przez 10 minut. Następnie komórki zawieszano w 1 ml MEM, wzbogaconym 10% roztworem inaktywowanej cielęcej surowicy płodowej. W komorze Thoma obliczano liczbę komórek i ich żywotność metodą z błękitem trypanu. Po wykonaniu obliczeń komórki rozcieńczano we wzbogaconym płynie Eagle'a do gęstości 2×10^6 . Do studzienek płytek (płaskodennych) dodawano po 100 μ l wzbogaconego podłoża Eagle'a zawierającego 2×10^6 limfocytów/ml. Komórki każdej próby nakraplano do czterech zespołów, z których każdy zawierał 3 studzienki. Do pierwszego dodawano 100 μ l podłoża, do drugiego 100 μ l PHA o stężeniu 5,0 μ g/ml, do trzeciego 100 μ l PHA o stężeniu 2,5 μ g/ml, a do czwartego 100 μ l PHA o stężeniu 1,25 μ g/ml. Płytki inkubowano przez 72 godziny w temperaturze 37°C lub 41°C w atmosferze 5% CO₂. Po inkubacji do każdej studzienki dodawano 1 microcurie H³-tymidyny (aktywność 40 Mbq/ml). Następnie prowadzono inkubację przez 24 godziny w temperaturze 37°C lub 41°C, w atmosferze 5% CO₂ (3). Po inkubacji mieszaninę przenoszono przy pomocy harwestera na bibuły, które następnie umieszczano w probówkach Eppendorffa wypełnionych 1 ml płynu scyntylicyjnego. Do oceny radioaktywności użyto licznika scyntylicyjnego promieniowania β . Wyniki były analizowane jako średnie wartości arytmetyczne z liczby rozpadów na minutę (Disintegrations per minute – DPM). Aktywność proliferacyjną limfocytów określono poprzez obliczenie średnich indeksów stymulacji tych komórek (IS).

$$IS = \frac{\text{DPM hodowli stymulowanej}}{\text{DPM hodowli niestymulowanej}}$$

Wpływ ochratoksyny w paszy na zdolność proliferacyjną limfocytów krwi obwodowej kur niosek. Badanie przeprowadzono na 18 kurach nioskach. Zarówno grupę badaną, jak i kontrolną stanowiło 9 kur – w każdej grupie

po 3 ptaki linii Cobb, Hubbard i Ross. Nioskom w grupie badanej podawano przez 14 dni doświadczalną mieszankę paszową zawierającą 0,5 ppm ochratoksyny A. Natomiast nioski w grupie kontrolnej otrzymywały w tym czasie standardową mieszankę paszową.

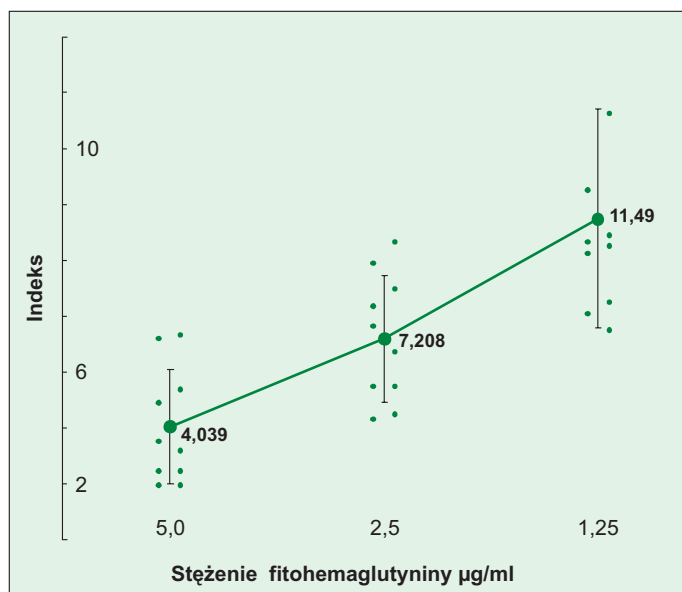
Krew do badań pobrano w 14. dniu doświadczenia. Do oceny aktywności immunologicznej limfocytów zastosowano test nieswoistej izotopowej transformacji blastycznej, w którym jako stymulator tych komórek w hodowlach zastosowano PHA o stężeniu 1,25 μ g/ml (stężenie określone na podstawie wyników standaryzacji TTBL). Aktywność immunologiczną limfocytów określono poprzez obliczenie średniej indeksów stymulacji tych komórek dla grupy badanej i kontrolnej, jak również średnich tego parametru dla grup badanych i kontrolnych poszczególnych linii kur niosek.

Wpływ ochratoksyny w paszy dla kur niosek na zdolność proliferacyjną limfocytów ich potomstwa. Doświadczeniem objęto stada reprodukcyjne typu mięsnego liczące po 60 kur i 8 kogutów w wieku 35 tygodni. Ptaki utrzymywano w boksach, na ściółce, w standardowych warunkach środowiskowych. Każde stado zostało podzielone na dwie grupy: kontrolną i badaną, liczące po 30 kur i 4 koguty. Ptaki w grupach kontrolnych żywiono standardową mieszanką dla kur reprodukcyjnych, natomiast grupy doświadczalne otrzymywały przez 4 tygodnie taką samą mieszankę, ale zawierającą 0,5 mg ochratoksyny A w 1 kg mieszanki. Wykonano również dwa lęgi testowe. Po 7 dniach karmienia kur paszą skażoną OA zebrano jaja z wszystkich grup do I nakładu, a po 14 dniach do II nakładu. W sumie z każdej grupy przeznaczono do lęgów po 150 jaj. Pisklęta z każdej grupy lęły się w osobnych pojemnikach. Przy wylęgu wszystkie pisklęta przeznaczone do odchowu zostały zważone i zaznaczone znaczkami pisklęcymi. Po wylęgu kurczęta pochodzące od kur Cobb, Hubbard i Ross żywiono mieszanką standardową (grupy kontrolne) i mieszanką zawierającą ochratoksynę A (grupy badane) odchowywano w oddzielnych przedziałach: osobno każdy lęg i osobno każda grupa, w sumie 12 przedziałów. Odchów trwał do wieku 7 tygodni. Kurczęta żywiono standardowymi mieszankami dla brojlerów.

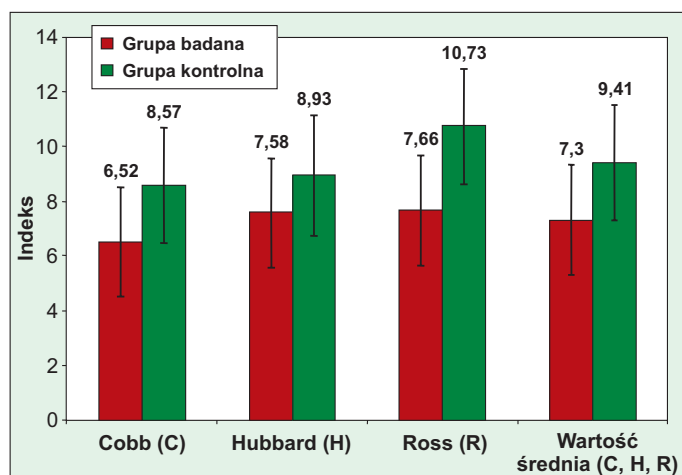
W 14., 21., 35. i 49. dniu odchowu kurczętom (w każdym terminie od 3 osobników z każdej grupy) pobierano krew do badań. Średnie indeksy stymulacji obliczone dla kurcząt z grup kontrolnych i doświadczalnych porównano testem t-Studenta. Różnicę średnich uznawano jako istotną na poziomie istotności $p \leq 0,05$. Obliczenia wykonano przy pomocy programu SPSS 17.0.

Wyniki i omówienie

Dokonano standaryzacji TTBL wykonywanego u kur niosek. Izolacja limfocytów krwi obwodowej była najbardziej wydajna, kiedy stosowano Gradisol o gęstości 1,077. Po zakończeniu wirowania i zebraniu komórek interfazy izolowano 97% limfocytów. Dla porównania: przy gęstości 1,075 tylko 85% agranulocytów stanowiły limfocyty, a przy gęstości 1,081 – 74%. Żywotność izolowanych komórek, obliczona metodą



Ryc. 1. Standaryzacja testu transformacji blastycznej – kształtowanie się średniej wartości indeksu stymulacji limfocytów w hodowlach stymulowanych różnymi stężeniami fitohemaglutyniny (PHA)



Ryc. 2. Średni indeks stymulacji limfocytów kur niosek po 14 dniach karmienia paszą z ochratoksyną A

z błękitem trypanu, wynosiła 99% ($\pm 0,55$). Najwyższy średni IS limfocytów o wartości 11,49 odnosił się do hodowli stymulowanych PHA o stężeniu 1,25 $\mu\text{g/ml}$ (ryc. 1). Przy stężeniach PHA 5,0 $\mu\text{g/ml}$ i 2,5 $\mu\text{g/ml}$ średnie wartości IS wynosiły, odpowiednio, 4,039 i 7,208. Najlepsze warunki do hodowli limfocytów krwi obwodowej kur niosek stwarzała temperatura 41°C (IS = 11,49).

TTBL wykazano supresyjne działanie ochratoksyny A zawartej w paszy podawanej nioskom na zdolność proliferacyjną limfocytów (średnie IS grupy badanej i kontrolnej wynosiły, odpowiednio, 7,30 i 9,41). Wykonane badania zdają się wskazywać, że najniższą wrażliwość na obecność OA w paszy wykazują limfocyty kur linii Hubbard (średnie IS limfocytów grup badanej i kontrolnej wynosiły, odpowiednio, 7,58 i 8,93), a najwyższą kury linii Ross (średnie IS limfo-

Tab. 1. Średnie wartości indeksu stymulacji limfocytów u potomstwa kur niosek karmionych paszą z ochratoksyną A ($\bar{x} \pm \text{SD}$; n = 3)

Wiek (dni)	Grupa	Linia		
		Cobb	Hubbard	Ross
14	K	1,14 \pm 0,12*	1,23 \pm 0,04*	1,26 \pm 0,05*
	B	0,82 \pm 0,09*	0,87 \pm 0,10*	0,69 \pm 0,07*
21	K	1,11 \pm 0,14*	1,24 \pm 0,05*	1,90 \pm 1,37
	B	0,68 \pm 0,15*	0,90 \pm 0,07*	0,80 \pm 0,06
35	K	1,32 \pm 0,21*	1,80 \pm 0,35*	2,03 \pm 0,62*
	B	0,86 \pm 0,08*	0,64 \pm 0,10*	0,75 \pm 0,11*
42	K	1,40 \pm 0,24*	1,94 \pm 0,37*	1,26 \pm 0,18*
	B	0,75 \pm 0,20*	0,64 \pm 0,27*	0,75 \pm 0,04*

Objaśnienia: * – różnice istotne statystycznie między grupami w danym wieku ($p \leq 0,05$); K – grupa kontrolna; B – grupa badana

cytów grup badanej i kontrolnej wynosiły, odpowiednio, 7,66 i 10,73) (ryc. 2). Potwierdzenie tych danych wymaga powtórzenia badań na szerszym materiale.

W dostępnej literaturze niewiele jest informacji na temat wpływu OA na aktywność limfocytów określaną TTBL u potomstwa pochodzącego od matek, które podlegały oddziaływaniu ochratoksyny A zawartej w paszy. Na podstawie uzyskanych wyników można wnioskować, że ochratoksyna A zawarta w paszy podawanej nioskom obniża aktywność limfocytów określaną TTBL u ich potomstwa w pierwszych 7 tygodniach życia (tab. 1). Mechanizm uszkadzającego wpływu OA nie jest znany. Hipotetycznie można sądzić, że tak długotrwałe obniżenie zdolności proliferacyjnej limfocytów u potomstwa niosek mogło wynikać m.in. z niszczącego działania OA na narządy limfatyczne zarodków. Zaburzenia toksyczne mają bowiem bardzo ostry charakter w intensywnie dzielących się tkankach narządów krwiotwórczych i odpowiedzialnych za kształtowanie odporności organizmu. Wcześniejsze badania Szeleszczuka i wsp. (12) potwierdziły taką możliwość. Przy pomocy TTBL potwierdzono niszczące działanie OA na komórki śledziony zarodka w odniesieniu do innej mikotoksyny wytwarzanej przez *Fusarium graminearum* i *F. culmorum* – deoksyniwalenolu (DON) (5). W teście transformacji blastycznej wykazano, że splenocyty izolowane ze śledziony zarodków poddanych oddziaływaniu DON prezentowały obniżoną aktywność.

Badania wpływu OA na aktywność limfocytów krwi innych gatunków zwierząt, w tym świń i bydła, również wykazały jej immunosupresyjne działanie (4, 10, 11).

Wyniki powyższych badań potwierdzają przydatność poddanego standaryzacji TTBL do oceny funkcji limfocytów krwi obwodowej u kur niosek karmionych paszą zawierającą OA oraz u ich potomstwa.

Piśmiennictwo

1. *Adair B. M., McNeilly C. D., McConnell D. G., Todd D., Nelson R. T., McNulty M. S.*: Effects of chicken anemia on lymphokine production and lymphocyte transformation in experimentally infected chickens. *Avian Dis.* 1991, 35, 783-792.
2. *Anusz K., Zaleska M., Lis M.*: Izolacja limfocytów krwi obwodowej krów i owiec ciężarnych w gradiencie Gradisolu G. *Medycyna Wet.* 1992, 47, 421-423.
3. *Bertram E. M., Jilbert A. R., Kotlarski L.*: Optimization of an in vitro assay which measures the proliferation of duck T lymphocytes from peripheral blood in response to stimulation with PHA and CONA. *Dev. Comp. Immunol.* 1997, 21, 299-310.
4. *Holmberg T., Thuvanier A., Hult K.*: Ochratoxin A as suppressor of mitogen induced blastogenesis of porcine blood lymphocytes. *Acta. Vet. Scand.* 1988, 29, 219-223.
5. *Moon Y., Kim H. K., Suh H., Chung D. H.*: Toxic alterations in chick embryonic liver and spleen by acute exposure to Fusarium – producing mycotoxin deoxynivalenol. *Biol. Pharm. Bull.* 2007, 30, 1808-1812.
6. *Niemiec J., Stepińska M., Riedel J., Szeleszczuk P.*: The effect of feeding ochratoxin A-contaminated diet to broiler breeding flocks on the chickens performance. *J. Anim. and Feed Sci., Suppl.* 2005, 471-474.
7. *Qureshi M. A., Brake J., Hamilton P. B., Hagler W. M. Jr., Nesheim S.*: Dietary exposure of broiler breeders to aflatoxin results in immune dysfunction in progeny chicks. *Poultry Sci.* 1998, 77, 812.
8. *Scofield V. L., Bose H. R.*: Depression of mitogen response in spleen cells from reticuloendotheliosis virus-infected chickens and their suppressive effect on normal lymphocyte response. *J. Immun.* 1978, 120, 1321-1325.
9. *Sharma J. M., Lee L. F.*: Effect of infectious bursal disease on natural killer cell activity and mitogenic response of chicken lymphoid cells: role of adherent cells immune suppression. *Infect. Immun.* 1983, 42, 747-754.
10. *Stec J., Rachubik J., Szczotka M., Kuźmak J.*: Effects of penicillium mycotoxins: citrinin, ochratoxin A, and patulin on in vitro proliferation of bovine lymphocytes. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2008, 52, 163-167.
11. *Stec J., Żmudzki J., Rachubik J., Szczotka M.*: Effects of Aflatoxin B₁, Ochratoxin A, Patulin, Citrinin, and Zearalenon on the in vitro proliferation of pig blood lymphocytes. *Bull. Vet. Inst. Pulawy* 2009, 53, 129-134.
12. *Szeleszczuk P., Niemiec J., Karpińska E., Bielecki W.*: Influence of different levels of ochratoxin A on morphological changes in immunological system and humoral and cellular immunity in hens and their progeny. *Archiv für Geflügelkunde.* 2007, 71, 19-24.
14. *Szeleszczuk P., Zaleska M., Szeleszczuk B. M.*: Zastosowanie testu transformacji blastycznej w immunologii weterynaryjnej. *Życie Wet.* 1989, 64, 195-199.
13. *Szeleszczuk P., Niemiec J., Zaleska M., Żbikowski A., Stepińska M., Świerczewska E.*: Wpływ eksperymentalnej intoksykacji ochratoksyną A niosek na sprawność układu odpornościowego ich potomstwa, [w:] Wieliczko A.: Patologia narządu rozrodczego ptaków – etiologia, diagnostyka i zwalczanie. Wrocław 2005, 81-86.
15. *Theis G. A.*: Effects of lymphocytes from Marek's disease infected chickens on mitogen response of syngenic normal chicken spleen cells. I. *Immun.* 1977, 118, 887-894.
16. *Wainberg M. A., Beiss B., Wahi R., Israel E.*: Thymic dependence of cell-mediated immunity to avian sarcomas in chickens. *Cell Immunol.* 1978, 45, 344-355.
17. *Whitfill C., Allen J., Gyles N. R., Johnson Z., Thoma J. A.*: Stimulation of progressor and regressor chicken leukocytes with con A, PHA-P, and Rous sarcoma tumor antigens. *Avian Dis.* 1984, 28, 944-958.

Adres autora: dr Magdalena Zaleska, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa; e-mail: Magdalena_zaleska@sggw.pl