UNIWERSYTET WARMIŃSKO-MAZURSKI W OLSZTYNIE
WYDZIAŁ MEDYCYNY WETERYNARYJNEJ



KATEDRA PREWENCJI WETERYNARYJNEJ I HIGIENY PASZ

lek. wet. Wojciech Trybowski

Wpływ jednoczesnego podawania toksyny T-2 i zearalenonu na kształtowanie się odsetka wybranych subpopulacji limfocytów B i T oraz wydzielanie cytokin w ścianie jelita biodrowego świń

Praca doktorska

Promotor: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM
Promotor pomocniczy: dr wet. inż. Paweł J. Wojtacha

Olsztyn, 2023 r

UNIWERSITY OF WARMIA AND MAZURY IN OLSZTYN

FACULTY OF VETERINARY MEDICINE



DEPARTMENT OF VETERINARY PREVENTION AND FEED HYGIENE

Wojciech Trybowski, DVM

Effects of simultaneous T-2 toxin and zearalenon dosage on the percentage of selected B and T lymphocytes subpopulations and cytokines expression in the porcine ileal wall

PhD thesis

Thesis supervisor: dr hab. Kazimierz Obremski, prof. UWM

Thesis co-supervisor: Promotor pomocniczy: dr wet. inż. Paweł J. Wojtacha

Olsztyn, 2023

Informacja o finansowaniu badań

Praca wykonana w ramach projektu finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki nr N N308 237936 pt. „Badania nad oddziaływaniem toksyny T-2 i zearalenonu na wybrane wskaźniki odpowiedzi immunologicznej jelita świni”



Dziękuję każdemu, za dobre słowo i zrozumienie przez cały czas powstawania tej pracy.

Przede wszystkim dziękuję mojemu Promotorowi dr hab. Kazimierzowi Obremskiemu, prof. UWM za jego nieocenione wsparcie podczas realizacji tego pomysłu badawczego, poświęcony czas, humor i inspirację do podejmowania kolejnych wyzwań. Serdeczność mi okazaną trudno jest mi wyrazić słowami.

Dziękuję mojej żonie Henryce i synom Mateuszowi i Piotrowi za uwagi i nieskończone wsparcie, dojrzałe zrozumienie, bez których nie udałoby się przejść tej drogi.

Wreszcie dziękuję moim Rodzicom i Rodzeństwu, bo bez nich z pewnością nie byłbym tym kim jestem dzisiaj.

Dziękuję!

Spis treści

	WYKAZ SKRÓTÓW	7
1.	Streszczenie	11
2.	Wstęp	15
2.1.	Mikotoksyny – zanieczyszczenia materiałów paszowych i pasz	15
2.2.	Charakterystyka trichotecenów	17
2.2.1.	Charakterystyka toksyny T-2	19
2.2.2.	Toksyna T-2 – immunotoksyczność	20
2.2.3.	Toksyna T-2 – wpływ na barierę jelitową	22
2.3.	Charakterystyka zearalenonu	23
2.3.1.	Immunomodulacyjne oddziaływanie zearalenonu	25
2.3.2.	Zearalenon – wpływ na barierę jelita i jego status immunologiczny	26
2.4.	Uzasadnienie przyjętego poziomu narażenia na toksynę T-2 i ZEN	28
3.	Cel pracy	31
4.	Materiał i metody	32
4.1.	Zwierzęta i procedury prowadzenia eksperymentu	32
4.2.	Procedura pobierania tkanek do badań	33
4.3.	Procedury oznaczania poziomu białka całkowitego i stężenia cytokin	33
4.4.	Procedura analizy cytometrycznej	35
4.5.	Analiza statystyczna	37
5.	Wyniki	37
5.1.	Cytokiny prozapalne	37
5.1.1.	Interferon gamma (IFN-γ)	37
5.1.2.	Interleukina 1 beta (IL-1ß)	38
5.1.3.	Interleukina 2 (IL-2)	38

5.1.4. Interleukina 12 (IL-12/23p40) 39
5.2. Cytokiny przeciwzapalne i regulatorowe 40
5.2.1. Interleukina 4 (IL-4) 40
5.2.2. Interleukina 10 (IL-10) 41
5.2.3. Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β) 41
5.3. Subpopulacje limfocytów T 42
5.3.1. Limfocyty T CD2+ 43
5.3.2. Limfocyty T CD4+ 44
5.3.3. Limfocyty T CD8+ 45
5.3.4. Limfocyty T CD4+CD8+ 45
5.3.5. Limfocyty TCRγδ+ 46
5.3.6. Limfocyty NK 47
5.3.7. Limfocyty śródnabłonkowe TCR αß+ z restrykcją MHC 47
5.4. Subpopulacje limfocytów B 48
5.4.1. Limfocyty B1 48
5.4.2. Limfocyty B2 49
6. Dyskusja 51
7. Wnioski 60
8. Literatura 61

Wykaz skrótów

15-aDON	15-acetylodeoksyniwalenol
3-aDON	3-acetylodeoksyniwalenol
AcNIV	Monoacetyloniwalenol
a-DON	Mono-acetylodeoksyniwalenol
B CD21+	Limfocyty B2 CD21+
B CD5+CD8-	Limfocyt B1
BEA	Beawerycyna
Caco – 2	Linia komórkowa ludzkich komórek gruczolakoraka jelita grubego
CAT	Katalaza
T CD5+CD8+	TCR αß+ limfocyty śródnabłonkowe T z restrykcją MHC
CD5-CD8+	Limfocyty NK
CD5-TCR+	Limfocyty TCRγδ+, limfocyty śródnabłonkowe
ConA	Konkanawalina
CONTAM	Panel EFSA ds. Środków Trujących w Łańcuchu Żywnościowym (ang. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain)
DAcNIV	Diacetyloniwalenol
DASD	Diacetoksyscirpenol
DNA	Kwas deoksyrybonukleinowy
DON	Deoksyniwalenol
ERK	Kinazy aktywowane mitogenami (ang. extracellular signal-regulated kinases)
FB1	Fumonizyna B1
FB2	Fumonizyna B2
FB3	Fumonizyna B3
FUC	Fuzarochromanon
FUP	Fusaproliferina
FUS	Fuzarenon-X
GALT	Tkanka limfatyczna przewodu pokarmowego (ang. mucosa-associated lymphoid tissue)
GLUT 5	Transporter glukozy 5

HCT116	Linia komórek raka jelita grubego człowieka
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa (ang. high performance liquid chromatography)
HT-2	Toksyna HT-2
HT29	Ludzka linia komórek raka okrężnicy
IEC	Komórki nabłonka jelitowego (ang. intestinal epithelial cell)
IFN-γ	Interferon gamma
IL-1	Interleukina 1
IL-10	Interleukina 10
IL-11	Interleukina 11
IL-12p40	Interleukina 12p40
IL-17	Interleukina 17
IL-1β	Interleukina 1β
IL-2	Interleukina 2
IL-23	Interleukina 23
IL-3	Interleukina 3
IL-4	Interleukina 4
IL-5	Interleukina 5
IL-8	Interleukina 8
IPEC-1	Komórki nabłonka jelita prosięcia (ang. intestinal porcine epithelial cell)
LOAEL	Najniższy poziom działania toksycznego (ang. lowest observed adverse effect level)
MAS	Monoacetoksyscirpenol
MLCK	Kinaza lekkich łańcuchów miozyny (ang. myosin light chain kinase)
MON	Moniliformina
MUC1	Polimorficzna mucyna nabłonkowa 1
MUC2	Polimorficzna mucyna nabłonkowa 2
MUC3	Polimorficzna mucyna nabłonkowa 3
NADPH	Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy
NEO	Neosolaniol

NET	Pozakomórkowe pułapki neutrofili (ang. neutrophil extracellular traps)
NFκB	Czynnik jądrowy kappa B (ang. nuclear factor kappa B)
NIV	Niwalenol
NK	Komórki NK (ang. natural killer)
NKT	Komórki NKT (ang. natural killer T-cells)
NOAEL	Poziom niewywołujący dające się zaobserwować szkodliwe skutki (ang. no observed adverse effect level)
PBS	Zbuforowany roztwór soli fizjologicznej
RFT	Reaktywne formy tlenu
RhoA/ROCK	Kinaza białkowa związana z Rho (ang. rho-associated protein kinase)
Ross 308	Brojlery hybrydowe
SGLT1	Kotransporter glukozy zależny od sodu (ang. sodium-glucose linked transporter 1)
SOD	Dysmutaza ponadtlenkowa
ß-ZAL	ß-zearalanol
ß-ZEL	ß-zearalenol
T CD2+	Limfocyt T CD2+
T CD4+	Limfocyty Th pomocnicze
T CD4+CD8+	Limfocyt T podwójnie pozytywne
T CD8+	Limfocyt T cytotoksyczny
T-2	Toksyna T-2
T84	Linia komórkowa gruczolakoraka
TCH	Trichoteceny
TEER	Transnabłonkowa oporność elektryczna (ang. transepithelial electrical resistance)
TGFβ	Transformujący czynnik wzrostu beta
THP-1	Linia komórkowa makrofagów
TNF-α	Czynnik martwicy nowotworów alfa
Treg	Limfocyt T regulatorowy
Tγδ	Limfocyt Tγδ
ZEN	Zearalenon

α-ZAL	α-Zearalanol
α-ZEL	α-Zearalenol

1. Streszczenie

Toksyna T-2 i zearalenon (ZEN) to mikotoksyny wytwarzane przez liczną grupę grzybów pleśniowych z rodzaj *Fusarium*, *Myrothecium*, *Spicellum*, *Stachybotrys*, *Cephalosporium*, czy Trichoderma. Zakwalifikowana do trichotecenów grupy A toksyna T-2 jest jedną z najsilniejszych cytotoksycznych mikotoksyn. ZEN jest jednocześnie mikotoksyną i ksenoestrogenem. W związku z budową cząsteczki zbliżoną do 17ß-estradiolu, ZEN wykazuje powinowactwo do receptorów estrogenowych. Generuje to szereg zaburzeń w czynnościach układu rozrodczego, ale nie tylko, ponieważ komórki immunokompetentne również zawierają receptory estrogenowe. Głównym wektorem przenoszącym toksynę T-2 i ZEN są zboża porażone grzybami pleśniowymi. Toksyna T-2 i ZEN wykazują wysoką stabilność na wysokie temperatury i ciśnienie co sprawia, że ich dezaktywacja jest prawie niemożliwa. Prowadzone do tej pory badania pozwoliły poznać skutki zdrowotne narażenia zwierząt gospodarskich na wysokie stężenia toksyny T-2 i ZEN. Jednak w dalszym ciągu mało jest danych, które opisują efekty jednoczesnego oddziaływania toksyny T-2 i ZEN w niskich stężeniach.

Mając na uwadze możliwość równoczesnego występowania obu mikotoksyn w paszach, podjęto badania, których celem była ocena skutków jednoczesnego, doustnego narażenia na niskie stężenia toksyny T-2 (14,5 µg/kg mc/dzień; 50 % dawki LOAEL) i ZEN (10 µg/kg m.c./dzień; dawka NOAEL) na wybrane parametry immunologiczne układu odpornościowego jelita biodrowego świni. Doświadczenie prowadzono przez okres 14, 28 i 42 dni. Celem badania po pierwsze było ustaleniu, czy toksyna T-2 i ZEN wpływają na przebieg kształtującej się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez ocenę stężeń cytokin prozapalnych (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-12/23p40), przeciwzapalnych i regulatorowych (IL-4, IL-10, TGFβ), odsetka subpopulacji limfocytów T CD2+, T CD4+, T CD8+, T CD4+CD8+, Tγδ, TCR αß+, NK, B CD5+(B1) i B CD21+ (B2). Po drugie, jaki wpływ wywierają toksyna T-2 i ZEN na odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8+ (Tc) i IFN-γ oraz odpowiedz humoralną/regulatorową związaną z limfocytami B CD21+ (B2) i IL-4.

W grupie zwierząt doświadczalnych poza spadkiem stężenia TGFβ, wykazano wzrost stężenia wszystkich cytokin zarówno prozapalnych jak i przeciwzapalnych/ regulatorowych. Odnotowano wzrost odsetka limfocytów T CD2+, Tc CD8+ i B CD5+ (B1) oraz spadek odsetka limfocytów B CD21+(B2) i Tγδ TCR+. Charakter

obserwowanych zmian stężeń cytokin w obrębie badanych obszarów ściany jelita biodrowego świadczą o rozwoju stanu zapalnego, który może przyczyniać się do wzrostu przepuszczalności bariery jelitowej i zaburzenia tolerancji pokarmowej. Profil obserwowanych zmian odsetka subpopulacji limfocytów T CD2+, T CD4+, T CD8+, Tγδ+, TCR αß+, NK, B CD5+ (B1) i B CD21+ (B2) oraz spadek odsetka limfocytów B CD21+(B2) świadczą o nasileniu odpowiedzi komórkowej.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że narażenie loszek na toksynę T-2 w dawce 14,5 µg/kg mc/dzień (50 % dawki LOAEL) i ZEN w dawce 10 µg/kg m.c./dzień (dawka NOAEL) podawanych jednocześnie przez co najmniej 14 dni wpływa negatywnie na funkcjonowanie układ immunologicznego jelita biodrowego świni. Narażenie na toksynę T-2 i ZEN wyzwala stan zapalny, nasila odpowiedź komórkową, może być powodem wzrostu przepuszczalności ściany jelita i może być czynnikiem tworzenia się tolerancji pokarmowej w jelicie biodrowym świni.

Effects of simultaneous T-2 toxin and zearalenon dosage on the percentage of selected B and T lymphocytes subpopulations and cytokines expression in the porcine ileal wall

Abstract

T-2 toxin and zearalenone (ZEN) are mycotoxins produced by a large group of moulds from the genera Fusarium, Myrothecium, Spicellum, Stachybotrys, Cephalosporium and Trichoderma. Classified as group A trichothecenes, T-2 toxin is one of the most potent cytotoxic mycotoxins. ZEN is both a mycotoxin and a xenoestrogen. Due to a molecular structure similar to 17ß-estradiol, ZEN has an affinity for oestrogen receptors. This generates a number of reproductive system disorders, but not only, as immunocompetent cells also contain oestrogen receptors. The main vector carrying T-2 toxin and ZEN is mould-infested cereals. T-2 toxin and ZEN toxin show high stability to high temperatures and pressure, which makes their inactivation almost impossible. Research to date has provided insight into the health effects of exposure of livestock to high concentrations of T-2 and ZEN toxin. However, there are still few data that describe the effects of simultaneous exposure to T-2 toxin and ZEN at low concentrations.

Considering the possibility that both mycotoxins may occur simultaneously in feedstuffs, a study was undertaken to evaluate the effects of simultaneous oral exposure to low concentrations of T-2 toxin (14.5 μg/kg b.w./day; 50% LOAEL dose) and ZEN (10 μg/kg b.w./day; NOAEL dose) on selected immune parameters of the pig hindgut immune system. The experiment was conducted over a period of 14, 28 and 42 days. The aim of the study was firstly to determine whether T-2 toxin and ZEN affect the course of the developing food tolerance in gilts by assessing the concentrations of pro-inflammatory cytokines (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-12/23p40), anti-inflammatory and regulatory cytokines (IL-4, IL-10, TGFβ), the percentage of T CD2+, T CD4+, T CD8+, T CD4+CD8+, Tγδ, TCR αß+, NK, B CD5+(B1) and B CD21+ (B2) lymphocyte subpopulations. Secondly, what effect do T-2 toxin and ZEN have on the cellular response associated with CD8+ (Tc) T cells and IFN-γ, and the humoral/regulatory response associated with CD21+ (B2) B cells and IL-4.

In addition to a decrease in TGFβ, the experimental animal group showed an increase in all cytokines, both pro-inflammatory and anti-inflammatory/regulatory. There was an increase in the percentage of CD2+ T lymphocytes, CD8+ Tc lymphocytes and CD5+ B

lymphocytes (B1) and a decrease in the percentage of CD21+(B2) B lymphocytes and Tγδ TCR+ lymphocytes. The nature of the observed changes in cytokine concentrations within the tested areas of the hindgut wall are indicative of the development of inflammation, which may contribute to increased intestinal barrier permeability and impaired gastrointestinal tolerance. The profile of observed changes in the percentage of CD2+ T-lymphocyte subpopulations, CD4+ T-lymphocyte subpopulations, CD8+ T-lymphocyte subpopulations, γδ+ T-lymphocyte subpopulations, TCR αß+ T-lymphocyte subpopulations, NK lymphocyte subpopulations, B CD5+ (B1) and B CD21+ (B2) lymphocyte subpopulations and a decrease in the percentage of B CD21+(B2) lymphocyte subpopulations are indicative of an enhanced cellular response.

Based on the results, it can be concluded that exposure of gilts to T-2 toxin at a dose of 14.5 µg/kg b.w./day (50% of the LOAEL) and ZEN at a dose of 10 µg/kg b.w./day (NOAEL dose) administered concurrently for at least 14 days negatively affects the immune function of the pig hindgut. Exposure to T-2 toxin and ZEN triggers inflammation, enhances the cellular response, may cause an increase in the permeability of the intestinal wall and may be a factor in the formation of food tolerance in the pig hindgut.

2. Wstęp

2.1. Mikotoksyny – zanieczyszczenia materiałów paszowych i pasz

W środowisku ludzi i zwierząt występuje wiele potencjalnie szkodliwych substancji. Wśród nich można wyszczególnić zanieczyszczenia środowiska będące skutkiem działalności przemysłu, związki naturalne występujące w roślinach, leki weterynaryjne, nawozy sztuczne oraz środki ochrony roślin stosowane w rolnictwie.

Konsekwencją zmian klimatycznych na ziemi, głównie temperatury i wilgotności są obserwowane zmiany schematów występowania pleśni i intensywności wytwarzanych przez nie mikotoksyn w różnych strefach klimatycznych (Tirado i in. 2010, Moretti i in. 2019). Mikotoksyny to niskocząsteczkowe produkty przemiany materii grzybów nitkowatych głównie z rodzaju *Aspergillus, Penicillium* i *Fusarium*, nazywane również metabolitami wtórnymi lub drugorzędowymi (Zhang i in. 2022). Ta liczna grupa związków zasadniczo nie jest warunkiem *sine qua non* dla produkującej je pleśni, natomiast ich działanie toksyczne dotyka zarówno człowieka, zwierząt, roślin czy drobnoustrojów. Mikotoksyny pełnią funkcję zootoksyn w przypadku, kiedy ich negatywne działanie odnosi się do zwierząt i człowieka, ale w sytuacji, gdy wpływają na metabolizm i rozwój roślin określamy je mianem fitotoksyn oraz antybiotyków hamujących wzrost bakterii czy grzybów. Najczęściej występującymi na świecie mikotoksyanami są aflatoksyny i ochratoksyny produkowane głównie przez pleśnie z rodzaju *Aspergillus* spp. i *Penicillium* spp. oraz trichoteceny, zearalenon i fumonizyny syntetyzowane głównie przez pleśnie z rodzaju *Fusarium* spp. (Bennett i Klich 2003). Z ekonomicznego punktu widzenia największe znaczenie mają jednak mikotoksyny *Fusarium* spp. w związku z wywoływanie zatruć u wielu gatunków zwierząt (Alshannaq i Yu 2017). Wśród najczęściej spotykanych mikotoksyn *Fusarium* spp. są trichoteceny, zearalenon, fumonizyny i moniliformina. Mikotoksyny wytwarzane przez gatunki *Fusarium* spp., a zanieczyszczające zboża przedstawiono w Tabeli 1.

Tabela 1. Mikotoksykogenne gatunki *Fusarium* związane ze zbożami i mikotoksyny (Logrieco i in. 2002).

Gatunki *Fusarium*	Mikotoksyny
F. acuminatum	**T-2, MON**, HT-2, DAS, MAS, NEO, BEA
F. anthophilum	BEA
F. avenaceum	**MON, BEA**
F. cerealis	**NIV, FUS, ZEN**, ZOH
F. chlamydosporum	**MON**
F. culmorum	**DON, ZEN, NIV**, FUS, ZOH, a-DON
F. equiseti	**ZEN, ZOH**, MAS, DAS, NIV, DAcNIV, FUS, FUC, BEA
F. graminearum	**DON, ZEN, NIV, FUS, a-DON**, DAcDON, DAcNIV
F. heterosporum	**ZEN**, ZOH
F. nygamai	BEA, FB_1, FB_2
F. oxysporum	**MON**, BEA
F. poae	**DAS, NIV, FUS**, MAS, T-2, HT-2, NEO, BEA
F. proliferatum	**FB_1, BEA, MON, FUP**, FB_2
F. sambucinum	**DAS**, T-2, NEO, ZEN, MAS, BEA
F. semitectum	**ZEN**, BEA
F. sporotrichioides	**T-2, HT-2, NEO**, MAS, DAS
F. subglutinans	**BEA, MON**, FUP
F. tricinctum	**MON**, BEA
F. verticillioides	**FB_1**, FB_2, FB_3

Ważne z punktu widzenia toksykologicznego mikotoksyny zaznaczono pogrubiona czcionką. Skróty: a-DON (mono-acetylodeoksyniwalenol: 3-aDON i 15-aDON); AcNIV (monoacetyloniwalenol); BEA (beawerycyna); DAcDON (diacetylodeoksyniwalenol: 3,15-aDON); DAcNIV (diacetyloniwalenol: 4,15-AcNIV); DAS (diacetoksyscirpenol); DON (deoksyniwalenol); FB_1 (fumonizyna B_1); FB_2 (fumonizyna B_2); FB_3 (fumonizyna B_3); FUP (fusaproliferina); FUS (fuzarenon-X); FUC (fuzarochromanon); HT-2 (toksyna HT-2); MAS (monoacetoksyscirpenol); MON (moniliformina); NEO (neosolaniol); NIV (niwalenol); T-2 (toksyna T-2); ZEN (zearalenon); ZOH (izomery α i β ZEN)

Poziomy skażenia mikotoksynami w dużym stopniu zależą od warunków rozwoju pleśni, na co wywiera wpływ wiele czynników, w tym przede wszystkim temperatura i wilgotność. Również szkody wyrządzone uprawom przez owady lub ptaki, a także inne

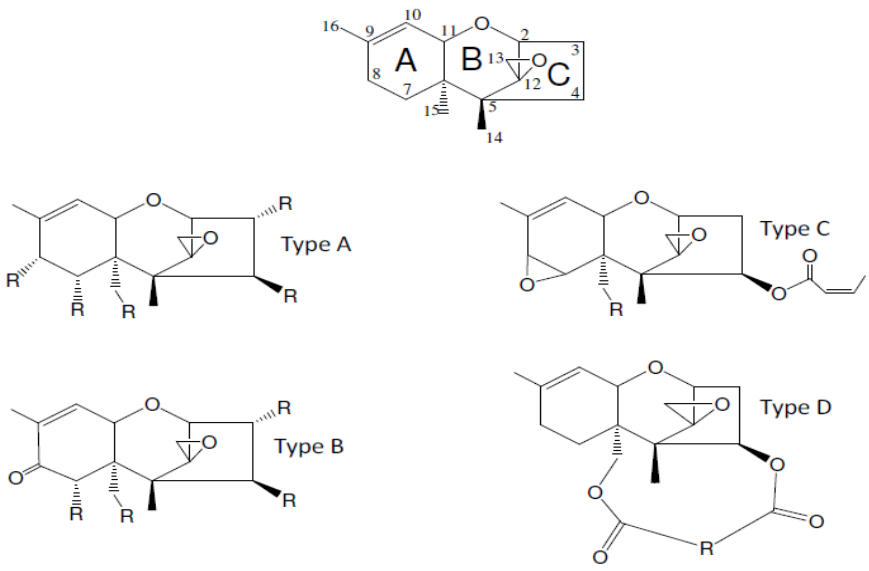
uszkodzenia mechaniczne, mogą wpływać na rozwój grzyba pleśniowego i produkcję mikotoksyn. Niewłaściwe obchodzenie się z materiałem po zbiorach (np. podczas przechowywania) może również sprzyjać rozwojowi pleśni i produkcji mikotoksyn. W przypadku kiszonek jakość surowca, stopień wypełnienia silosu, dodatki i szczelność wypełnienia silosu czy rękawa mają wpływ na rozwój pleśni i produkcję mikotoksyn (Cheli i in. 2013). Jednak wspomniany wcześniej aspekt zmian klimatycznych jest decydującym czynnikiem nasilającym z roku na rok wzrost stopnia skażenia mikotoksynami zbóż podczas wegetacji (Tirado i in. 2010, Moretti i in. 2017, 2019).

Nawet po usunięciu pleśni wytwarzających mikotoksyny są one nadal obecne w materiale i nie ulegają degradacji z upływem czasu. Mikotoksyny są również bardzo odporne na wysoką i niską temperaturę, przez co bardzo trudno usunąć je z materiałów paszowych i pasz. Chociaż wypracowano kilka metod częściowego usuwania mikotoksyn z surowców paszowych, to utrzymanie odpowiednich warunków podczas uprawy, zbioru i przechowywania jest nadal najlepszym sposobem na utrzymanie poziomu skażenia mikotoksynami na jak najniższym poziomie (Karlovsky i in. 2016). Poziomy stężeń kilku mikotoksyn podlegają regulacjom Unii Europejskiej, które zalecają ich maksymalne poziomy w paszach i materiałach paszowych (European Commission 2006, 2011, 2016). Zanieczyszczenie pasz i materiałów paszowych mikotoksynami ma również wpływ ekonomiczny. Mikotoksykozy zwierząt powodują szereg zaburzeń zdrowotnych u zwierząt gospodarskich, w tym działanie immunosupresyjne, nefrotoksyczne, hepatotoksyczne, neurotoksyczne, czy zaburzenia w rozrodzie, prowadzą do utraty dochodów i wzrostu kosztów prowadzonej hodowli (Magnoli i in. 2019).

2.2. Charakterystyka trichotecenów

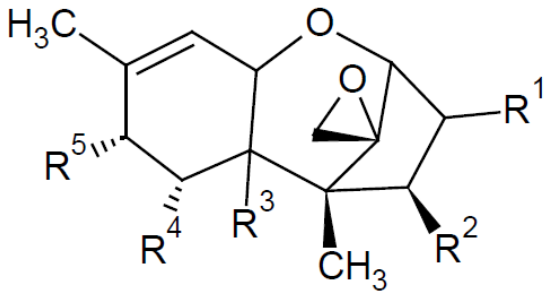
Trichoteceny (TCH) są jedną z najliczniejszych grup mikotoksyn wytwarzanych przez pleśnie *Fusarium* spp. W swojej strukturze chemicznej zawierają pierścienie seskwiterpenowe charakteryzujące się jądrem 12,13-epoksy-trichothec-9-enowym, który jest odpowiedzialny za ich toksyczność (Hussein i Brasel 2001). Ta grupa toksyn charakteryzuje się masą cząsteczkową około 200-500 Da (Pestka 2007). Na podstawie kryterium właściwości chemicznych cząsteczki TCH podzielono na cztery typy oznaczone literowo od A do D (Rocha i in. 2005, McCormick i in. 2011) (Ryc. 1). W typie A zgrupowano związki, które przy węglu C8 posiadają grupę hydroksylową (neosolaniol),

grupę estrową (toksyna T-2) lub pozbawione tlenu podstawniki (diacetyloscirpenol, trichodermina). Typ B przy węglu C8 posiada grupę ketonową (karbonylową) i często przy węglu C7 grupę hydroksylową, charakterystyczną dla mikotoksyn produkowanych przez rodzaj *Fusarium* spp. (deoksyniwalenol, niwalenol, trichotecyna). W typie C w pozycji C7-C8 znajdujemy grupę epoksydową, czego przykładem może być krotocyna. Jednakże najbardziej złożonym strukturalnie TCH jest typ D, gdyż zawiera dodatkowy pierścień, który łączy węgle w pozycji C4 i C15, czego przykładem jest roridyna A, satratotoksynia H, czy werrukaryna A (Rocha i in. 2005, McCormick i in. 2011).



Ryc.1. Budowa strukturalna trichotecenów poszczególnych grup (McCormick i in. 2011)

Najważniejsze mikotoksyny TCH są wytwarzane głównie przez gatunki z rodzaju *Fusarium* spp. (Rahman i in. 2021). Jak wcześniej wspomniano TCH charakteryzują się strukturą pierścieniową 12,13-epoksytrichotec-9-enową, a ten pierścień 12,13-epoksydowy decydująca o ich działaniu toksycznym (Sudakin 2003). Chociaż do tej pory zidentyfikowano ponad 200 trichotecenów, to żywność lub paszę dla zwierząt zanieczyszczają głównie toksyna T-2, diacetoksyscirpenol (DAS), deoksyniwalenol (DON) i niwalenol (NIV) oraz niektóre rzadziej występujące pochodne tych toksyn, takie jak 3-acetyldeoksyniwalenol (3ADON), 15-acetyldeoksyniwalenol (15ADON), toksyna FUS i HT-2 (Ryc. 2)



	R^1	R^2	R^3	R^4	R^5
DON	OH	H	OH	OH	O
3-a DON	OAc	H	OH	OH	O
15-aDON	OH	H	OAc	OH	O
T-2	OH	OAc	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$
HT-2	OH	OAc	OAc	H	$OCOCH_2CH(CH_3)_2$

Ryc. 2. Struktury chemiczne DON, T-2 i ich głównych metabolitów

2.2.1. Charakterystyka toksyny T-2

Toksyna T-2 (3, hydroksy-4, 8, 15-diacetoksy- 8a-(3-metylobutyryloksy) - 12,13epoksytrichothec-9-en) jest nielotnym związkiem o niskiej masie cząsteczkowej (MW 466,52), nierozpuszczalnym w wodzie i eterze naftowym, ale łatwo rozpuszczalnym w acetonie, octanie etylu, alkoholu etylowym, alkohol metylowym, chloroformie i glikolu propylenowym. Jest wysoce odporna na inaktywację pod wpływem ciepła i światła UV. Dlatego nie jest powszechnie dezaktywowana podczas rutynowego procesu produkcji żywności lub pasz. Toksyna T-2 została po raz pierwszy wyizolowana w 1977 r. z pleśni *Fusarium tricinctum* (*Fusarium sporotrichioides*) (Ueno 1977). Jest to związek mogący być produkowany przez wiele gatunków pleśni z rodzaju *Fusarium, Trichoderma, Trichothecium Myrothecium, Stachybotrys, Spicellum, Cephalosporium, Verticimonosporum* (Richard 2007, McCormick i in. 2011), ale również przedstawicieli zaliczanych do rzędu *Hypocereales*, czy także workowców *Ascomycota* (Webster i Weber 2007). Rodzaj *Fusarium* z reprezentującymi go *F. poae*, *F. sporotrichoides*, *F. equiseti*, czy *F. acuminatum* to przede wszystkim patogeny roślin uprawnych. To one są

odpowiedzialne za zanieczyszczenie toksyną T-2 ziarniaków pszenicy, jęczmienia, owsa, kukurydzy, grochu, ryżu czy soi. Jak donosi literatura pasożytujący na melonie i pomidorach *Myrothecium* i bytujący w wilgotnych pomieszczeniach S*tachybotrys* są czynnikiem etiologicznym chorób człowieka (Flemming i in. 2004).

Toksyna T-2 jest obecna w wielu strefach klimatycznych, ale szczególnie zanieczyszcza pasze i żywność pochodzące ze strefy subtropikalnej i tropikalnej, ale również jest częsta w strefie klimatu umiarkowanego (Ahmadi i Riazipour 2008). Głównymi czynnikami, które sprzyjają rozwojowi rodzaju *Fusarium* na ziarniakach zbóż jest podwyższona temperatura i wilgotność. *Fusarium* wytwarza toksynę T-2 w dość dużym zakresie temperatur, bo obejmującym zakres od 0 do 32°C, przy kulminacji syntezy w temperaturze 15°C. Wysokiemu zanieczyszczeniu toksyną T-2 zbóż czy pasz sprzyja niedosuszenie ziarna i zbyt wysoka temperatura i wilgotność warunków magazynowania (Rocha i in. 2005, EFSA 2011).

Spośród wszystkich TCH toksyna T-2 jest jedną z najsilniejszych cytotoksycznych mikotoksyn o których wiadomo, że wywołuje śmiertelne reakcje toksyczne u ludzi i zwierząt (Joseph i in. 2004).

2.2.2. Toksyna T-2 – immunotoksyczność

Z uwagi na obecność toksyny T-2 w paszach, najważniejszą drogą narażenia zwierząt na toksynę T-2 jest przewód pokarmowy. Po wniknięciu do organizmu toksyna T-2 działa szczególnie destruktywnie na grupę komórek proliferujących (Rosenstein i in. 1981, Königs i in. 2009, Janik i in. 2021). Jest to szczególnie widoczne w nabłonku jelitowym, grasicy, śledzionie, węzłach chłonnych, czy szpiku kostnym. Jednorazowe narażenie myszy na doustną dawkę 10 mg toksyny T-2/kg m.c. wywołuje zauważalny wzrost poziomu apoptozy w kępkach Peyera oraz w krezkowych węzłach chłonnych. Z kolei doświadczalne narażenie na doustną dawką 0,75 mg toksyny T-2/kg m.c. wywołało atrofię w grasicy. Zaobserwowano również pewne różnice narządowe w powstawaniu zmian apoptotycznych i tak największy jej stopień wystąpił w grasicy, średnie natężenie jej natężenie jej negatywnego oddziaływania zaobserwowano w kępkach Peyera, a najmniej zmian odnotowano w krezkowych węzłach chłonnych (Gutleb i in. 2002, Van Loveren i Piersma 2004, Minervini i in. 2005, Vlata i in. 2005, Hymery i in. 2006, 2009, Meissonnier i in. 2008b).

Hymery i wsp. zaobserwowali, że toksyna T-2 podawana *per os* myszom w zakresie od 0,1mg do 2,5mg skutkowała w makrofagach stymulowanych jednocześnie LPS spadkiem produkcji takich cytokin, jak IL-6, TNFα, czy IL-1β (Hymery i in. 2009). W innych badaniach prowadzonych *in vitro*, w zależności od stężenia toksyny T-2 obserwowano efekty zbliżone w postaci hamowania wydzielania IL-1β. Badania pokazują, że niskie dawki toksyny T-2 powodują wzrost syntezy i wydzielania IL-12 i TNFα, natomiast wysokie dawki wywołują efekt przeciwny w postaci ograniczenia ich wydzielania. Dowiedziono, że komórki dendrytyczne cechują się wysoką wrażliwością na odziaływanie toksyny T-2, która wywiera negatywny efekt na proces ich dojrzewania (Bimczok i in. 2007, Hymery i in. 2006). Zaobserwowano, że 48 godz. inkubacja komórek dendrytycznych z toksyną T-2 wywołuje spadek powierzchniowej ekspresji markera CD86 oraz zmniejszenie produkcji IL-10 i IL-12.

Badaniami objęto również ocenę działania toksyny T-2 na subpopulacje limfocytów T CD4+ i T CD8+. W doświadczeniu *in vitro* na mysich limfocytach śledzionowych stymulowanych konkanawaliną A (ConA) i traktowanych niskimi dawkami toksyny T-2 (0,23 ng/ml), komórki manifestowały większą zdolność proliferacyjną, niż gdy były narażone na wyższe stężenia mikotoksyny (1,2 ng/ml). W innym badaniu wystąpił spadek proliferacji kurzych limfocytów, gdy hodowle traktowano toksyną T-2 w dawce powyżej 1 ng/ml i całkowite zatrzymanie proliferacji przy obecności w środowisku stężenia toksyny T-2 na poziomie 10 ng/ml. Jednocześnie zaobserwowano, że witamina E wykazuje działania protekcyjne do toksyny T-2 (Jaradat i in. 2006, Wang i in. 2023). Badania dowodzą dualnego oddziaływania toksyny T-2. W niskich dawkach wynoszących 0,08 mg/kg m.c. w 7 i 14 dniu narażenia, pojawiała się stymulacja układu immunologicznego. Z kolei spadek aktywności był obserwowany po zastosowaniu wysokich dawek toksyny T-2 (1,6 mg/kg m.c.). W szeregu doświadczeń w warunkach *in vitro* limfocyty były poddawane działaniu toksyny T-2 i jej pochodnej toksynie HT-2. Komórki wyizolowane z mysiej śledziony traktowane przez 2 dni dawką 0,5 – 2,5 ng toksyny T-2/ml wykazywały obniżenie syntezy IL-2, przy jednoczesnym po 7 dniach wzrostem wytwarzania IL-4 i IL-5. Splenocyty pozyskane od myszy, a otrzymujące przez 14 dni *per os* toksynę T-2 po stymulacji konkanawaliną A (ConA), wykazywały wzrost wytwarzania IL-2 i IL-3 IFN-γ.

2.2.3. Toksyna T-2 – wpływ na barierę jelitową

Nabłonek jelitowy jest swoistym filtrem dla wody i składników pokarmowych, ale nie działa tylko jako fizyczna bariera dla bakterii komensalnych, obcych antygenów i toksyn. Jest również aktywnie zaangażowany w przetwarzanie antygenu i regulację komórek odpornościowych (Kinchen i in. 2018).

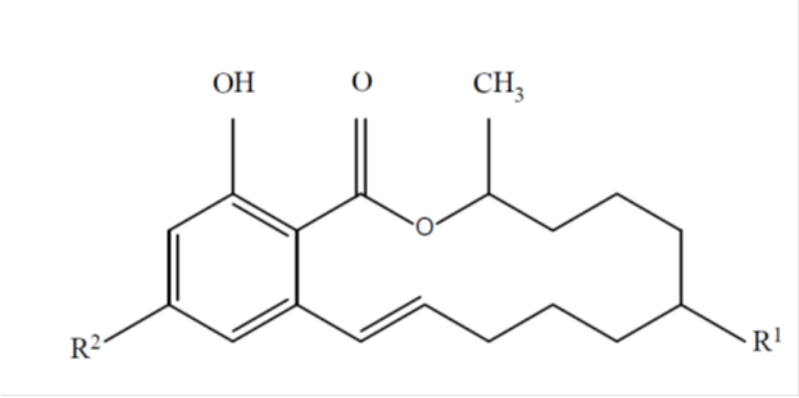
Najbardziej widocznym efektem ekspozycji zwierząt na TCH jest spadek apetytu, a w związku z tym ilości pobieranego pokarmu, co skutkuje spadkiem masy ciała. Jak podają Awad i wsp. jest to spowodowane zaburzeniem procesów wchłaniana składników pokarmowych (Awad i in. 2008). Badania *in vitro* z wykorzystaniem linii komórkowej Caco – 2, wykazały wpływ mikotoksyn TCH na spadek aktywności licznych transporterów błony komórkowej enterocytów (Pinton i in. 2012). 48 godzinny wpływ DON-u w stężeniu 10 μmol/l na hodowlę komórek Caco – 2 spowodował spadek aktywności transportera D-fruktozy, transportera D-galaktozy/D-glukozy, aktywności zarówno aktywnego, jak i biernego transportu L-seryny, przy równoczesnym wzroście transportu palmitynianu (Kasuga i in. 1998). Podobny rezultat osiągnięto w badaniach prowadzonych na ludzkiej linii komórkowej HT29, gdy narażono je na działanie DON-u w stężeniu 10 μmol/l. Stwierdzono wówczas hamowanie błonowych transporterów glukozy zależnych od jonów Na^+ (SGLT1), transportu D-fruktozy przez 5 transporter D – glukozy (GLUT 5) oraz biernego transportu L-seryny. Przy 10 krotnie wyższych stężeniach DON-u, aktywność innych transporterów rosła, a SGLT1 nie (Maresca i in. 2002). U myszy narażonych doustnie na DON w dawkach od 0 do 10 mg/kg paszy, zaobserwowano zburzenia we wchłanianiu L-tryptofanu, L-leucyny, D-glukozy i żelaza. Również u drobiu oprócz zakłócenia transportu D – glukozy, miał miejsce spadek wchłaniania L-proliny. W tym przypadku DON spowodował silną inhibicję transportera proliny zależnego od jonów Na^+ (Awad i in. 2007).

TCH w znacznym stopniu wpływają na zmiany przepuszczalności bariery jelitowej, co wykazały badania ich oddziaływania na żywotność takich linii komórkowych T84, HT29 i Caco 2. Zmiany dotyczyły między innymi spadku syntezy białka, zmniejszenia żywotności i proliferacji komórek. DON wywierał cytotoksyczne oddziaływanie na komórki linii świńskiego nabłonka jelitowego IPEC-1. Równocześnie toksyna T-2 podawana myszom *in vivo* wywołała już 6 godzin od jej podania również silny spadek indeksu mitotycznego komórek nabłonka krypt jelitowych (Sergent i in. 2006).

Używany do oceny przepuszczalności błony śluzowej jelita pomiar oporu elektrycznego (TEER), dostarcza informacji o budowie nabłonka i stanie połączeń ścisłych występujących pomiędzy komórkami. Metoda okazała się bardzo pomocna w wyjaśnieniu działania TCH na barierę jelitową, ponieważ doświadczenia na liniach komórkowych Caco 2, T84 i HT29, potwierdziły wpływ trichotecenów na zmiany szczelności bariery jelitowej. DON zależnie od wysokości dawki obniżał opór transepitelialny, czym zwiększał przepuszczalność hodowanych nabłonków. Podobne efekty obserwowano przy zastosowaniu komórek linii IPEC-1 (świński nabłonek jelitowy), które okazały się bardziej czułe od komórek ludzkich Caco 2. Tą zależność można przypisać pochodzeniu poszczególnych linii komórkowych. Komórki Caco 2 pochodzą z ludzkiego gruczolaka okrężnicy, a linie IPEC-1 pozyskuje się z nabłonka jelit zdrowych prosiąt. Ponadto linia Caco 2 morfologicznie przypomina jelito cienkie, chociaż została pozyskana z jelita grubego, a komórki IPEC-1 pochodzą z nabłonka jelita krętego i czczego. Badania wykazały, że linie komórkowe pochodzące od człowieka wydają się być bardziej odporne na oddziaływanie DON-u niż te pozyskane od świń (Awad i in. 2012).

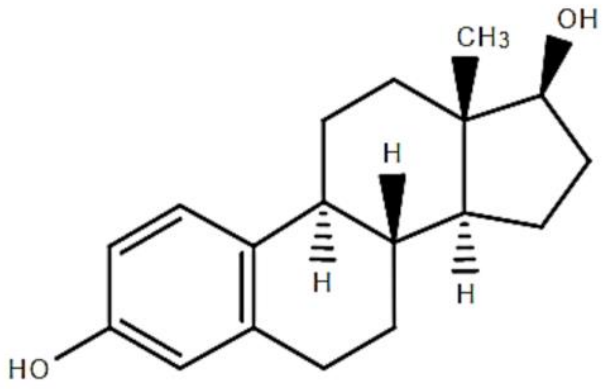
2.3. Charakterystyka zearalenonu

Oprócz mikotoksyn z grupy trichotecenów ważnym związkiem produkowanym przez grzyby pleśniowe jest mikotoksyna zearalenon (ZEN) (Ryc. 3). ZEN również znany jako μ-lakton kwasu 6-(10-hydroksy-6-okso-trans-1-undecenylo) -β-rezocylowego (Bennett i Klich 2003) jest fuzariotoksyną należącą do klasy ksenoestrogenów ze względu na jej strukturalne podobieństwo do 17ß-estradiolu (Ryc. 4), ale również z powodu na powinowactwo wiązania z receptorami estrogenowymi (Rogowska i in. 2019).



	R^1	R^2
ZEN	O	OH
α-ZEL	OH (α)	OH
ß-ZEL	OH (ß)	OH

Ryc. 3. Wzór strukturalny ZEN i jego pochodne.



Ryc. 4. Struktura chemiczna 17ß-estradiolu (Bulgaru i in. 2021).

ZEN jest wytwarzany przez *Fusarium graminearum, Fusarium cerealis, Fusarium semitectum, Fusarium culmorum* i *Fusarium equiseti* (Maragos 2010, Złoch i in. 2020). Grzyby te występują na prawie wszystkich kontynentach i porażają zarówno przed, jak i po zbiorze pszenicę, jęczmień, ryż, kukurydzę i inne uprawy, powodując skażenie mikotoksynami żywności i pasz dla zwierząt na całym świecie (Zinedine i in. 2007). ZEN wiążąc się z receptorami estrogenowymi u ssaków, prowadzi do zaburzeń rozrodu, co szczególnie dotyczy samic świń (Jia i in. 2020). Pod względem właściwości fizykochemicznych wykazano, że ZEN ma wysoką stabilność na czynniki fizyczne. Brak wrażliwości na wysokie temperatury i promieniowanie UV sprawia, że jego dezaktywacja jest prawie niemożliwa (Zhou i in. 2020).

Metabolizm ZEN odbywa się głównie w enterocytach błony śluzowej jelita i w wątrobie, gdzie ulega przekształceniu w kilka metabolitów poprzez reakcje hydroksylacji, glukuronidacji lub koniugacji (Kowalska in. 2016). Biotransformacja ZEN prowadzi przede wszystkim do powstania dwóch metabolitów, α-zearalenolu (α-ZEL) i ß-zearalenolu (ß-ZEL), które w dalszej kolejności mogą redukować się do α-zearalanolu (α-ZAL) i ß-zearalanolu (ß- ZAL) (Busk i in. 2011, Fruhauf i in. 2019).

Po podaniu doustnym ZEN jest stosunkowo szybko wchłaniany i ocenia się, że u ssaków jest to na poziomie 80–85% (króliki, szczury, ludzi i świnie) (Zinedine i in. 2007, Rogowska i in. 2019). Jak wspomniano ZEN zaliczany do grupy do fitoestrogenów (mikoestrogenów), strukturalnie wykazuje silne podobieństwo do 17 ß-estradiolu i jest zdolny do wiązania się z receptorami estrogenowymi (Bennett 2003). Z tego powodu zatrucie ZEN najczęściej prowadzi do zaburzeń w układzie rozrodczym. Objawy obejmują obniżoną płodność, nieprawidłowy rozwój płodu, zmniejszenie liczebności miotu oraz modyfikację poziomu określonych hormonów rozrodczych, takich jak estradiol i progesteron (Marin i in. 2011). Jednakże ZEN przejawia swoją toksyczność wobec wielu innych układów poza reprodukcyjnym. Badania pokazują, że narażenie na tę mikotoksynę wpływa również na funkcjonowanie wątroby i śledziony. W eksperymencie prowadzonym na samicach prosiąt wykazano, iż nadmierne ilości ZEN podnoszą aktywność kluczowych enzymów wątrobowych, takich jak peroksydaza glutationowa oraz zmniejszają masę śledziony (Chang i in. 2018). ZEN wywiera znaczący wpływ na odpowiedź immunologiczną, główny mechanizm obronny przeciwko patogenom, toksynom i innym antygenom u wszystkich ssaków, poprzez działanie immunostymulujące lub immunosupresyjne (Pierron i in. 2016). Jednak w dostępnej literaturze stosunkowo mało miejsca poświęca się wpływowi ZEN na mechanizmy komórkowej odpowiedzi immunologicznej.

2.3.1. Immunomodulacyjne oddziaływanie zearalenonu

Odporność wrodzona lub niespecyficzna jest pierwszą formą obrony organizmów wielokomórkowych. Wrodzona odpowiedź immunologiczna jest wyzwalana przez receptory, które rozpoznają patogen i aktywują szereg szlaków sygnałowych kontrolujących odpowiedź immunologiczną (Medzhitov i Janeway 2000). Neutrofile, komórki NK i NKT, monocyty/makrofagi i komórki dendrytyczne, które pośredniczą w interakcjach z patogenami, są wrodzonymi składnikami układu odpornościowego, zdolnymi do tworzenia sieci, które odgrywają kluczową rolę we wstępnej odpowiedzi immunologicznej na infekcję i uszkodzenia tkanek (Shaw i in. 2010). Są to komórki fagocytarne, które po stymulacji mogą wytwarzać reaktywne formy tlenu (RFT), ważne w sygnalizacji komórkowej i homeostazie (Edreva 2005, Chen i in. 2016). Brak równowagi między produkcją RTF a jego nieefektywną eliminacją prowadzi do dramatycznego

wzrostu poziomów RTF prowadzącego do uszkodzenia komórek, znanego jako stres oksydacyjny (Edreva 2005). Wang i in. donieśli, że ZEN w dawkach 5, 10, 20 μM zwiększył produkcję RFT w neutrofilach bydlęcych, a zmniejszył aktywność enzymów przeciwutleniających, dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) i katalazy (CAT) poprzez aktywację dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego (NADPH), kinazy ERK i białka p38, a następnie tworzenie się pozakomórkowych pułapek neutrofili (NET - neutrophil extracellular traps), czy sieci zewnątrzkomórkowych włókien DNA, które pomagają komórkom neutrofili zabijać pozakomórkowe patogeny (Wang i in. 2019, Wu i in. 2023), co w konsekwencji może mieć istotne konsekwencje cytotoksyczne i prozapalne.

Wyniki badań Marin i in. pokazują, że ZEN i jego metabolity zmniejszały żywotność komórek polimorfojądrowych u świń, syntezę IL-8 i zwiększały produkcję nadtlenków. Badania wskazały na fakt, że metabolity ZEN są bardziej immunotoksyczne niż samo ZEN (Marin i in. 2010). Ponadto Murata i in. stwierdzili, że wpływ ZEN i jego metabolitów na neutrofile bydlęce zależy od ich budowy chemicznej (Murata i in. 2003). Potwierdzili, że ZEN i α - i β-zearalenole tłumiły chemiluminescencję PMA zależną od luminolu w neutrofilach z powodu ich podwójnych wiązań C1'-2', podczas gdy ZEN i α- i β-zearalanole nie wywierały tego efektu, ponieważ posiadają uwodornione wiązanie C1'-2' zamiast wiązania podwójnego. Doświadczenia *in vivo* przeprowadzone na brojlerach hybrydowych Ross 308 karmionych po wykluciu deoksyniwalenolem i zearalenonem w dwóch stężeniach wykazały, że toksyny indukują stres oksydacyjny i znacząco hamują aktywność fagocytarną komórek krwi (Borutova i in. 2008). W połączeniu z innymi mikotoksynami (alternariol, deoksyniwalenol) ZEN wpływa na wrodzone funkcje odpornościowe poprzez hamowanie np. różnicowania monocytów w makrofagi (linia komórkowa THP-1).

2.3.2. Zearalenon – wpływ na barierę jelita i jego status immunologiczny

Jelito stanowi fizyczną barierę, która zapewnia organizmowi ochronę przed czynnikami środowiskowymi, w tym mikotoksynami (Groschwitz i Hogan 2009). Bariera ta obejmuje komórki nabłonka jelit (IEC), ale także składniki odporności wrodzonej i nabytej, takie jak IgA i prozapalne cytokiny lub cząsteczki zaangażowane w hamowanie kolonizacji bakteryjnej (mucyny i peptydy przeciwdrobnoustrojowe) (Vancamelbeke i Vermeire 2017).

Lahjouji i in. podali, że jelita są celem ZEN, który powoduje patologiczne zmiany w tkance jelita (Lahjouji i in. 2020). W zależności od wielu czynników, takich jak gatunek, płeć, dawka lub czas ekspozycji, ZEN może wpływać lub nie wpływać na prawidłową strukturę anatomiczną jelita. Na przykład ZEN w dawce 40 μg/kg m.c. nie zmienił grubości błony śluzowej, wysokości kosmków ani liczby komórek kubkowych u świń (Gajęcka i in. 2016, Lewczuk i in. 2016), ale spożycie ZEN w dawce 0,3–146 mg/kg paszy u ciężarnych szczurów zmodyfikowano strukturę kosmków i zmniejszyło ekspresję białek łączeniowych (Liu i in. 2014). Już w pierwszym tygodniu przewlekłego narażenia świń na ZEN dawką 40 μg/kg m.c. obserwowano przejściowe zmiany morfologiczne jelita cienkiego i wzrost liczby komórek Panetha w kryptach jelitowych (Lahjouji i in. 2020).

Ekspozycja na ZEN wiąże się z upośledzeniem żywotności komórek, apoptozą i martwicą różnych narządów, w tym jelit (Johansson i in. 2013, Zheng i in. 2018). Zastosowanie w hodowli *in vitro* ZEN w dawce 10–100 μM przez 24 godziny zmniejsza żywotność komórek nabłonka jelita świni IPEC-J2 (Wang i in. 2019) i IPEC-1 (Marin i in. 2015, Taranu i in. 2015), a zwiększa aktywność LDH (Wang i in. 2019). Apoptoza jest jednym z głównych mechanizmów związanych z toksycznością indukowaną przez ZEN w jelitach i wykazano, że ZEN może powodować apoptozę w różnych komórkach nabłonka jelitowego, takich jak IPEC-J2 (Fan i in. 2018), MODE-K (Long i in. 2018) i HCT116 (Ben Salem i in. 2015). Obserwowano, że ekspozycja samic świń rasy wielkiej białej polskiej na niskie dawki ZEN zwiększała apoptozę i zmniejszała proliferację limfocytów w kępkach Peyera w jelicie krętym (Obremski i in. 2015).

Niektóre badania wykazały, że ekspozycja na ZEN zmienia odsetek wybranych subpopulacji limfocytów T i B w jelicie cienkim. Narażenie na ZEN (5 lub 20 mg/kg m.c.) myszy BALB/C zwiększyło odsetek komórek T CD8+ i zmniejszyło odsetek komórek T CD4+ w blaszce właściwej błony śluzowej, podczas gdy nie stwierdzono wpływu na limfocyty T CD8+ i B CD19 + w kępach Peyera (Islam i in. 2017). Również ekspozycja loszek przed okresem dojrzewania na 100 μg ZEN/kg paszy zmniejszyła odsetek limfocytów B CD21+ w jelicie krętym świni (Obremski i in. 2015).

Wpływ ZEN uruchamianie reakcji zapalnej w jelicie nie jest zbyt jasny, a fakt ten prawdopodobnie wynika z różnych modeli eksperymentalnych i różnych stężeń ZEN zastosowanych w kilku badaniach. Badania prowadzone *in vitro* wykazały, że inkubacja świńskich komórek jelitowych IPEC-1 z odpowiednio 10 i 40 μM ZEN prowadzi do zwiększonej ekspresji genów kodujących cząsteczki zaangażowane w stan zapalny, takie

jak TLR i cytokiny: IL-1β, TNF-α, IL-6, IL-8, czy IL-12p40 (Taranu i in. 2015) oraz IL-1β i TNF-α w komórkach IPEC-J2 (Wan i in. 2014). Wzrost ekspresji cytokin prozapalnych (IL-1β i TNF-α) zarejestrowano również w badaniach *in vivo* w jelicie czczym myszy otrzymujących 20 mg ZEN/kg m.c. Również u loszek przed okresem dojrzewania poddanych działaniu 100 μg ZEN/kg paszy przez 42 dni stwierdzono podwyższone stężenia IL-12/23 40p i IL-1β w jelicie krętym (Obremski, i in. 2015). Z kolei inni badacze odkryli, że ZEN nie ma wpływu na prozapalną syntezę cytokin IL-8 przez komórki IPEC-1 (Marin i in. 2015) lub zmniejsza ekspresję genów IL-1β, TNF-α i IL-8 w jelicie czczym szczurów po narażeniu ich na ZEN w różnych dawkach (0,3–146,0 mg/kg paszy) (Liu i in. 2014). Również badanie mikro macierzy przeprowadzone na komórkach IPEC-1 narażonych na dawkę 25 μM ZEN wykazało spadek ekspresji cytokin prozapalnych IL-8, TNF-α i IL-6 (Braicu i in. 2016). Co interesujące efekt zapalny wytwarzany przez ZEN może być przenoszony z matki na potomstwo, czego dowodzą badania prosiąt pochodzących od macior karmionych pasza zawierającą 300 ppb ZEN w okresie na tydzień przed porodem, czego efektem w okresie laktacji było wystąpienie stanu zapalnego w jelitach (Benthem de Grave i in. 2016).

2.4. Uzasadnienie przyjętego poziomu narażenia na toksynę T-2 i ZEN

Bezpieczeństwo żywności i pasz to jeden z priorytetów Unii Europejskiej, stąd liczne dokumenty legislacyjne regulujące m.in. maksymalne zalecane poziomy skażenia mikotoksynami żywności i pasz (European Commission, 2006, 2011, 2016).

Głównym czynnikiem stymulującym dojrzewanie jelit po urodzeniu jest dieta (Liu i in. 2016), a kontakt z mikroorganizmami inwazyjnymi, ksenobiotykami, czy mikotoksynami ma kluczowe znaczenie w nieprawidłowym rozwoju i dojrzewaniu GALT, którego rola ochronna jest niezwykle ważna dla prawidłowych funkcji i utrzymania homeostazy w układzie pokarmowym. Badania eksperymentalne układu odpornościowego w jelitach mają ogromne znaczenie dla nauk biomedycznych i wymagają odpowiedniego modelu. Wydaje się, że najlepszym modelowym zwierzęciem do badania fizjologii i patologii układu żołądkowo-jelitowego jest świnia (Pabst 2020), która jako wszystkożerca jest bliższa ludziom niż innym gatunkom zwierząt. Badania nad patofizjologią układu immunologicznego jelit u świni są również ważne dla medycyny weterynaryjnej, ponieważ gatunek ten ma niezwykle duże znaczenie ekonomiczne,

a zaburzenia funkcji przewodu pokarmowego stanowią znaczną część wszystkich schorzeń u tego gatunku

GALT jest największą i najbardziej skomplikowaną częścią ogólnego układu immunologicznego, a błona śluzowa przewodu pokarmowego jest miejscem największego kontaktu organizmu ze środowiskiem zewnętrznym. Odporność wrodzona przewodu pokarmowego jest budowana przez komórki błony śluzowej, neutrofile, makrofagi, komórki dendrytyczne i komórki NK. Na odporność adaptacyjną układu odpornościowego, składają się limfocyty T i komórki B, które po aktywacji odpowiednio mają za zadanie wydzielać cytokiny i wytwarzać przeciwciała (Obremski i in. 2015b). W warunkach prawidłowych w błonie śluzowej przewodu pokarmowego wytwarza się ściśle kontrolowana równowaga między wydzielanymi cytokinami prozapalnymi (TNFα, IL-1, IL-6, IL-8, IL-17 i IL-23), a przeciwzapalnymi (IL-5, IL-10, IL-11 i TGFβ), gdzie neutrofile wraz z innymi typami komórek inicjują stan zapalny przez wydzielanie prozapalnych cytokin w celu dalszej aktywacji adaptacyjnego układu odpornościowego (Wallace i in. 2014).

W roku 2006 w Unii Europejskiej wprowadzono zalecenie określające dopuszczalny limit mikotoksyn w paszach dla zwierząt gospodarskich. Według tej rekomendacji poziom ZEN w paszach dla dorosłych świń nie powinien przekroczyć 250 µg/kg paszy. Dla prosiąt i loch górną granicą jest poziom 100 µg/kg paszy (European Commission 2006). Przyjęto założenie, że takie poziomy powinny wykluczy negatywny wpływ ZEN na układ rozrodczy świń (EFSA 2011). Badania morfometryczne sromu i macicy świń narażonych na działanie ZEN, pozwoliły ustalić jego poziom niewywołujący dających się zaobserwować szkodliwych skutków (NOAEL – no observed adverse effect level) na 10,4 µg ZEN/kg mc/dzień dla prosiąt i 40 µg ZEN/kg mc dla dojrzałych płciowo samic świń (EFSA 2014). W wspomnianym powyżej zaleceniu nie znalazła jednak swojego odniesienia toksyna T-2. Dla wielu mikotoksyn ustalono poziom NOAEL i LOAEL, czyli najniższy poziom działania toksycznego (lowest observed adverse effect level). Natomiast w przypadku toksyny T-2 dla świń zbyt mała liczba badań uniemożliwiła ustalić wartość NOAEL, natomiast najniższy poziom działania toksycznego LOAEL określono na poziomie 29 µg/kg m.c. (EFSA 2011). W 2013 r zostało opublikowane zalecenie wskazujące orientacyjne poziomy sumy toksyn T-2 i HT-2 w zbożach i produktach zbożowych, gdzie jako sugerowany poziom w mieszankach paszowych,

z wyjątkiem karmy dla kotów określono na poziomie 250 µg/kg (European Commission 2013).

Prowadzone przez lata badania pozwoliły scharakteryzować skutki narażenia zwierząt gospodarskich na wysokie stężenia toksyny T-2 i ZEN. Jednak w dalszym ciągu niewiele wiadomo na temat efektów oddziaływania tych mikotoksyn na niskim poziomie podawanych samych lub w mieszaninie i to szczególnie poniżej zaleceń i norm obowiązujących w Unii Europejskiej na zdrowie i produkcyjność zwierząt, a w szczególności na funkcjonowanie tkanki limfatycznej funkcjonującej w obrębie jelita cienkiego.

3. Cel pracy

Mając na uwadze negatywny wpływ zarówno toksyny T-2, jak i ZEN na organizm zwierząt, a szczególnie na funkcjonowanie ich układu immunologicznego, podjęto się oceny skutków jednoczesnego doustnego podawania niskich stężeń toksyny T-2 i ZEN przez okres 14, 28 i 42 dni na wybrane parametry układu immunologicznego obecnego ś ścianie jelita biodrowego. Wysokość narażenia na toksynę T-2 ustalono na poziomie 14,5 μg/kg mc/dzień, co stanowiło 50 % dawki LOAEL, natomiast dawka ZEN wynosiła 10 μg/kg m.c./dzień, co było równe dawce NOAEL.

Cele szczegółowe dotyczyły oceny jednoczesnego narażenia drogą pokarmową na toksynę T-2 i ZEN na następujące parametry immunologiczne ściany jelita biodrowego:

1. Ocena przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez pomiar stężenia wybranych cytokin prozapalnych (IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-12/23p40) oraz przeciwzapalnych i regulatorowych (IL-4, IL-10, TGFβ).
2. Ocena przebiegu procesu kształtowania się u loszek tolerancji pokarmowej poprzez określenie odsetka wybranych subpopulacji limfocytów: T CD2+, T CD4+, T CD8+, T CD4+CD8+, Tγδ, TCR αß+, NK oraz B CD5+(B1) i B CD21+(B2).
3. Ocena wpływu toksyny T-2 i ZEN na odpowiedź komórkową związaną z limfocytami T CD8+ (Tc) i IFN-γ i odpowiedź humoralną/regulatorową związaną z limfocytami B CD21+ (B2) oraz IL-4.

4. Materiał i metody

4.1. Zwierzęta i procedury prowadzenia eksperymentu

Wszystkie procedury dotyczące badań na zwierzętach były zgodne z polskim ustawodawstwem i zostały przeprowadzone zgodnie z decyzją Lokalnej Komisji Bioetycznej do spraw Badań nad Zwierzętami nr 55/2008.

Doświadczenie przeprowadzono na 30 loszkach rasy wielka biała polska w wieku 8 tygodni, o masie ciała 18–20 kg. Loszki podzielone na grupę kontrolną (Kontrola, n=15) i grupę doświadczalną (T-2/ZEN, n=15) były utrzymywane w oddzielnych kojcach ze stałym dostępem do wody. Okres adaptacji zwierząt do nowych warunków przed rozpoczęciem doświadczenia trwał 7 dni. Loszki karmiono pełnoporcjową komercyjną paszą o składzie zamieszczonym w Tabel 1 (Wytwórnia Pasz PIAST Sp. z o. o., Płońsk, Polska). W związku ze zmieniającym się w okresie wzrostu zapotrzebowaniem loszek na składniki pokarmowe, do uzyskania 25 kg masy ciała świniom podawano Paszę 1, a następnie do zakończenia doświadczenia Paszę 2. Grupa doświadczalna otrzymywała toksynę T-2 w dawce 14,5 µg/kg m.c./dzień (T-2 Toxin, T4887, Sigma-Aldrich, USA) i ZEN w dawce 10 µg/kg m.c./dzień (Zearalenon, Z2125, Sigma-Aldrich, USA) (Tab. 2). Dzienną dawkę mikotoksyn modyfikowano co tydzień odpowiednio do wzrastającej masy ciała loszek. Toksyny były umieszczone w żelatynowych kapsułkach i podawane wraz z paszą w czasie porannego karmienia. Celem zapewnienia wszystkim zwierzętom takiego samego traktowania (stres manipulacyjny), loszkom grupy kontrolnej podawano w tym samym czasie puste żelatynowe kapsułki.

Każdorazową partię paszy poddano badaniu na obecność toksyny T-2, aflatoksyny B1, ochratoksyny A, zearalenonu, α-zearalenolu i deoksyniwalenolu przy użyciu metody wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) z detekcją FLD i/lub UV (Agilent Technologies 1100, Santa Clara, CA, USA). Badania wykazały brak obecności mikotoksyn powyżej progu detekcji metody analitycznej.

Tabela 2. Skład mieszanek paszowych wg deklaracji producenta.

Składniki	Jednostka miary	Pasza 1	Pasza 2
Energia metaboliczna	MJ	13,80	13,00
Białko ogólne	%	6,00	16,00
Włókno surowe	max %	2,63	4,94
Sód	%	0,21	0,18
Wapń	min %	0,73	0,58
Fosfor ogólny	min %	0,65	0,73
Lizyna	%	1,27	1,04
Metionina + cystyna	%	0,83	0,64
Treonina	%	0,72	0,59
Tryptofan	%	0,26	0,20
Witamina A	j.m.	15000	13500
Witamina D_3	j.m.	2000	2000
Witamina E	mg	100	60

Całkowity czas trwania eksperymentu wynosił 42 dni, natomiast próbki do oceny stanu wydzielania cytokin i odsetka subpopulacji limfocytów w ścianie jelita biodrowego przeprowadzono w 14 i 28 i 42 doświadczenia każdorazowo od 5 losowo wybranych osobników z każdej z grup. Loszkom podano w iniekcji domięśniowej azaperon w dawce 4 mg/kg m.c. (Stresnil, Jansen Pharmaceutica NV, Belgia) i po 15 minutach dokonano eutanazji poprzez dożylne podanie pentobarbitalu sodu w dawce 0,6 ml/kg m.c. (Morbital, Biowet Puławy, Polska).

4.2. Procedura pobierania tkanek do badań

Bezpośrednio po eutanazji pobrano 5 cm fragmenty ściany jelita biodrowego położone ok. 7 cm przed zastawką krętniczo-kątniczą. Tkanki przeznaczone do analizy stężenia cytokin przechowywano w temperaturze -80 °C, natomiast tkanki przeznaczone do analizy cytometrycznej analizowano bezpośrednio.

4.3. Procedury oznaczania poziomu białka całkowitego i stężenia cytokin

Próbki ściany jelita biodrowego o masie 1g homogenizowano w buforze do ekstrakcji o składzie: PBS (P4417 Sigma-Aldrich, USA), 0,5 % cytrynian sodu (POCH, Poland), 0,05% Tween 20 (Sigma Aldrich, USA) oraz inhibitory proteaz (Ref 11 697 498 001, Roche, Polska) za pomocą homogenizatora (Omni-TipsTM Disposable, Omni

International). Uzyskany homogenat wirowano (8600 *g*) przez 1 godzinę (wirówka Eppendorf 5804R), a nadsącz rozdozowano do eppendorfów i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu wykonania oznaczeń.

Poziom białka całkowitego wykonano wg metody Bradford z nieznacznymi modyfikacjami własnymi (Bradford 1976). Do analizy wykorzystano płytkach titracyjne 96-dołkowe, do których pipetowano po 10 µl próbek standardów, próbek odczynnikowych i ekstraktów tkankowych. Dołki uzupełniono 290 µl odczynnika Bardford [mieszanina 100 mg Coomasie Brilinat blue G250 (Serva), 50 ml etanolu (POCH, Gliwice), 100 ml 85% kwasu ortofosforowego, 850 ml wody redestylowanej]. Płytki inkubowano 10 min. w temperaturze pokojowej. Jako standardu użyto albuminy bydlęcej BSA (Sigma Aldrich-Merck Millipore) w roztworze PBS, która posłużyła jako punkt odniesienia stężenia cytokin. Absorbancję zmierzono spektrofotometrem płytkowym TECAN Infinite M200 (Männedorf, Switzerland) przy długości fali λ=595 nm.

Oznaczenie stężenia IFN-γ, IL-1β, IL-2, IL-12/23p40, IL-4, IL-10 i TGFβ wykonano używając komercyjne testy ELISA (Tab. 3) a oznaczenia za pomocą spektrofotometru płytkowego (TECAN Infinite M200, Männedorf, Switzerland) przy długości fali λ = 492 nm. Uzyskane wyniki stężeń cytokin przedstawiano w pg/mg białka całkowitego.

Tabela 3. Komercyjne zestawy testów ELISA użyte do oznaczenia stężenia cytokin w ścianie jelita biodrowego świń.

Antygen	**Test ELISA, numer katalogowy**	**Producent**	**Zakres testu pg/ml**
IFN-γ	Porcine IFN-gamma DuoSet ELISA, DY985	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA	62,5 - 4000 Intra-assay CV<3,4% Inter-assay CV<4,6%
IL-1β	Porcine IL-1 beta/IL-1F2 DuoSet ELISA, DY681	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA	62,5 - 4000 Intra-assay CV<1,1% Inter-assay CV<3,2%
IL-2	Swine IL-2 CytoSet™ CSC124	Invitrogens™, Camarillo, CA, USA	35,6–570 Intra-assay CV<4,48% Inter-assay CV<5,02%
IL-12/23p40	Porcine IL-12/IL-23 p40 DuoSet ELISA, DY912	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA	78,1 - 5000 Intra-assay CV<3,67% Inter-assay CV<4,25%
IL-4	Porcine IL-4 DuoSet ELISA, DY654	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA	156,0 - 10000 Intra-assay CV<5% Inter-assay CV<6,69%

IL-10	Porcine IL-10 DuoSet ELISA, DY693B	R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA	23,4 - 1500 Intra-assay CV<3% Inter-assay CV<4,64%
TGFβ	TGF beta-1 Multispecies Matched Antibody Pair, CHC1683	ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA	62,5 – 4000 Intra-assay CV<2,9% Inter-assay CV<5%

4.4. Procedura analizy cytometrycznej

Przeznaczone do analizy cytometrycznej wybranych populacji limfocytów (Tabela 4) fragmenty jelita wypłukano w buforowanej soli fizjologicznej (PBS, pH 7,4, 0,1 M), a następnie drobno pocięto, co pozwoliło na wypłukanie z nich komórek układu limfatycznego przy pomocy PBS. Po odwirowaniu komórek i usunięciu nadmiaru PBS, osad rozdozowano do probówek, a komórki policzono w komorze Fuchs-Rosenthala. Następnie przygotowano zawiesiny o koncentracji komórek 10^6/µl, które użyto do immunofenotypowania. Proces immunofenotypowania polegał na wyznakowaniu poszczególnych podklas limfocytów przy pomocy podwójnych barwień z użyciem następujących kombinacji przeciwciał pierwotnych (Tabela 5). Jako przeciwciała wtórne (Tabela 6) posłużyły przeciwciała wyznakowane barwnikami fluorescencyjnymi: izotiocyjanianem fluoresceiny (FITC) oraz fikoerytryną (PE). Dodatkowo wykonano 3 kontrole: bez fluorochromów i z fluorochromami PE i FITC, ale bez przeciwciał pierwotnych. Następnie wybarwione komórki zostały utrwalone 0,4 1% paraformaldehydem, która gwarantowała 24-godzinną trwałość próbek. Tak przygotowane próbki, zostały niezwłocznie przetransportowane do Pracowni Cytometrii Przepływowej Zakładu Diagnostyki Laboratoryjnej Katedry Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW w Warszawie, gdzie zostały poddane analizie w cytometrze przepływowym FACScalibur, a dane były analizowane w programie Cell QuestTM (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA).

Tabela 4. Badane subpopulacje limfocytów.

Antygen	**Gatunek**
CD2+	Limfocyty T
CD4+	Limfocyty Th pomocnicze
CD8+	Limfocyty T cytotoksyczne
CD4+CD8+	Limfocyty podwójnie pozytywne
CD5-TCR+	Limfocyty TCRγδ+, limfocyty śródnabłonkowe
CD5+CD8+	TCR αß+ limfocyty śródnabłonkowe T z restrykcją MHC
CD5-CD8+	Limfocyty NK
CD5+CD8-	Limfocyty B1
CD21+	Limfocyty B2

Wszystkie odczynniki dostarczone pochodziły z Pharmingen, San Diego, CA, USA

Tabela 5. Przeciwciała pierwotne użyte w analizie cytometrycznej.

LP	**Wykrywany antygen**	**Klasa immunoglobulin**	**Numer katalogowy**
P1	CD2	IgG2a	MSA4
P2	CD4	IgG2b	74-12-4
P3	CD5	IgG1	PG114A
P4	CD8α	IgG2a	76-2-11
P5	CD21	IgG1	BB6-11C9
P6	TCR1-N7	IgG1	86D

Wszystkie odczynniki dostarczone pochodziły z Pharmingen, San Diego, CA, USA

Tabela 6. Przeciwciała wtórne użyte w cytometrii przepływowej.

Oznaczenie	**Klasa immunoglobulin lub ligand**	**Znacznik**	**Numer katalogowy**
S1	Mysie IgG1	Fikoerytryna (PE)	550083
S2	Mysie IgG2a	Izotiocyjanian fluoresceiny (FITC)	553390
S3	Mysie IgG2b	Biotyna	550333
S-PE	Biotyna	PE	554061

Wszystkie odczynniki dostarczone pochodziły z Pharmingen, San Diego, CA, USA

4.5. Analiza statystyczna

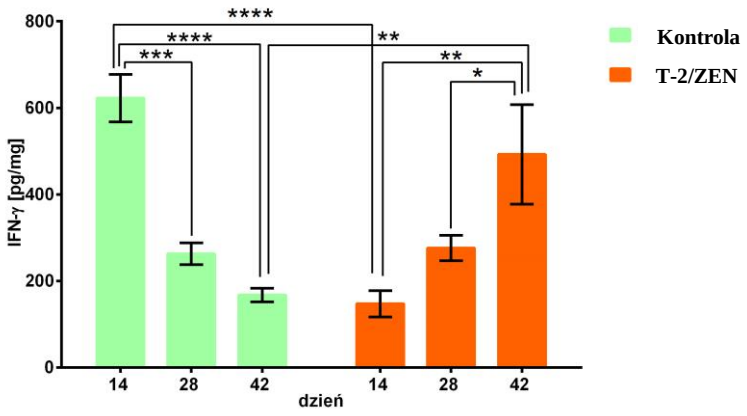
Uzyskane wyniki pomiarów opracowano za pomocą programów Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) oraz Graph Pad Prism 5 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Dla wszystkich badanych grup wyliczono wartości średnie i standardowy błąd średniej (SEM). Do zbadania rozkładu populacji zastosowano test Kołmogorowa – Smirnowa. W celu analizy statystycznej zebranych wyników stosowano test t niesparowany i jednostronny test Anova. Wartości $p < 0,05$ uznano za istotne statystycznie.

5. Wyniki

5.1. Cytokiny prozapalne

5.1.1. Interferon gamma (IFN-γ)

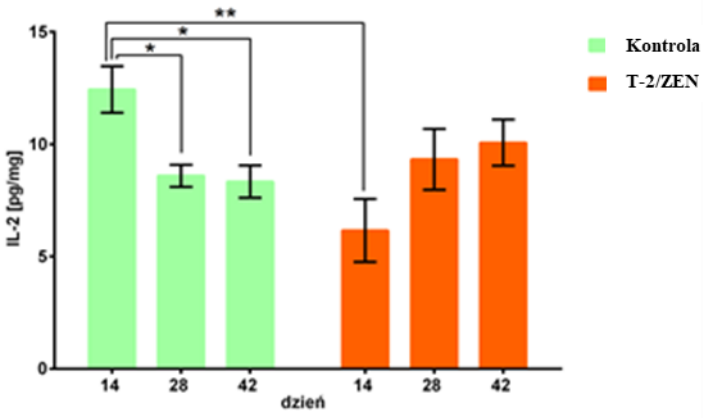
Zawartość IFN-γ w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej w trakcie doświadczenia przyjęła tendencję spadkową od 623,50 ± 54,90 pg/mg (dzień 14) przez 264,00 ± 25,40 (dzień 28; p<0,001 w odniesieniu do dnia 14) do 168,50 ± 15,70 pg/mg (dzień 42; p<0,0001 w odniesieniu do dnia 14) (Ryc. 5). Odmienny schemat wydzielania IFN-γ zaobserwowano w grupie zwierząt narażonych na podawanie toksyny T-2 i ZEN, gdzie nastąpił wzrost wydzielania od poziomu 147,30 ± 30,53 (dzień 14) przez 276,30 ± 29,46 (dzień 28) i 492,60 ± 114,98 (dzień 42; odpowiednio p<0,05 w odniesieniu do dnia 14 i p<0,01 w odniesieniu do dnia 14). Różnice istotne statystycznie pomiędzy grupą kontrolną dotyczyły odpowiednio dnia 14. (p<0,0001) i 42. (p<0,01) (Ryc. 5).



Ryc. 5 Średnie stężenie IFN-γ w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. ** – różnica statystycznie istotna przy p<0,01; *** – różnica statystycznie istotna przy p<0,001; **** – różnica statystycznie istotna przy p<0,0001.

5.1.2. Interleukina 1 beta (IL-1ß)

Wydzielanie IL-1ß w grupie loszek kontrolnych w poszczególnych terminach spadało od 376,50 ± 38,89 pg/mg (dzień 14) przez 291,70 ± 17,45 pg.mg (dzień 28) do wartości 218,20 ± 28,74 pg.mg (dzień 42). W przypadku zwierząt otrzymujących mieszaninę toksyny T-2 koncentracja IL-1ß w ścianie jelita biodrowego wykazywał nieliniowy wzrost od 326,00 ± 6,93 pg/mg (dzień 14) przez 332,80 ± 51,77 pg/mg (dzień 28) do 324,10 ± 53,10 pg/mg (dzień 42). Zarówno w 28, jak i 42 dniu eksperymentu stężenia IL-1ß były statystycznie istotnie wyższe w porównaniu do grupy kontrolnej (p<0,05) (Ryc. 6).

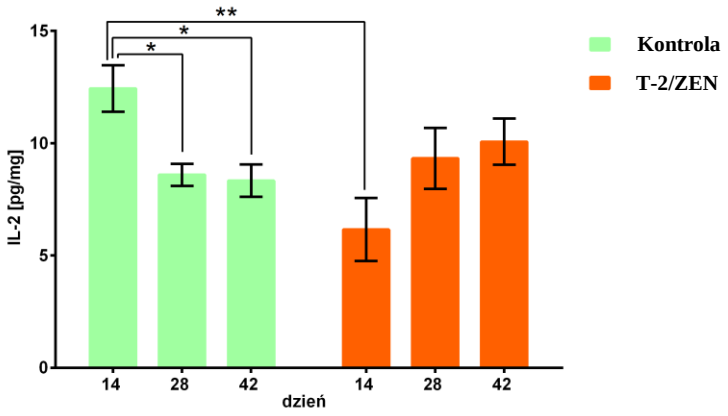


Ryc. 6. Średnie stężenie IL-1ß w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy p<0,05.

5.1.3. Interleukina 2 (IL-2)

W czasie przebiegu eksperymentu stężenie IL-2 w grupie kontrolnej (Ryc. 7) wykazało istotny statystycznie spadek od wartości 12,70 ± 1,10 pg/mg (dzień 14) przez 8,75 ± 0,50 ng/mg (dzień 28; p<0,05 w odniesieniu do 14 dnia doświadczenia) do 8,30 ± 0,80 pg/mg (dzień 42, p<0,05 w odniesieniu do 14 dnia doświadczenia). Z kolei odmienny

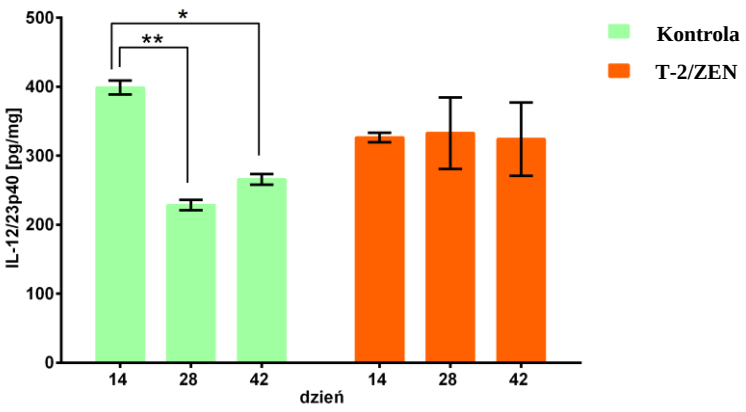
przebieg zmian wydzielania IL-2 wystąpił w ścianie jelita biodrowego świń narażonych na łączne podawanie toksyny T-2 i ZEN. (Ryc. 7). Stężenie IL-2 wzrastało z poziomu 6,16 ± 1,40 pg/mg w dniu 14 do 10,07 ± 1,03 pg/mg w 42 dniu eksperymentu. 14 dni narażenia na toksynę T-2 i ZEN spowodowało 48% statystycznie istotnie niższe stężenie w grupie doświadczalne w porównaniu do grupy kontrolnej (p<0,01).



Ryc. 7. Średnie stężenie IL-2 w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy p<0,05; ** – różnica statystycznie istotna przy p <0,01.

5.1.4. Interleukina 12 (IL-12/23p40)

Średnie wydzielanie IL-12/23p40 w ścianie jelita biodrowego zwierząt grupy kontrolnej wykazało statystycznie istotny spadek z 397,85 ± 11,30 pg/mg w 14 dniu badania do 229,50 ± 7,90 pg/mg w dniu 28 (p<0,01) i 266,70 ± 7,50 pg/mg w 42 dniu doświadczenia (p<0,05). Synteza interleukiny IL-12/23p40 w grupie loszek narażonej na działanie toksyny T- i ZEN była praktycznie na wyrównanym poziomie, zawierającym się w przedziale wartości od 326,00 ± 6,93 pg/mg (dzień 14) do 332,80 ± 51,77 pg/mg (dzień 42). Zestawiając je z wartościami uzyskanymi w grupie kontrolnej poza dniem 14, były wyższe odpowiednio o ok. 31 % i ok. 18 % w porównaniu do 28 i 42 dnia doświadczenia (Ryc. 8).

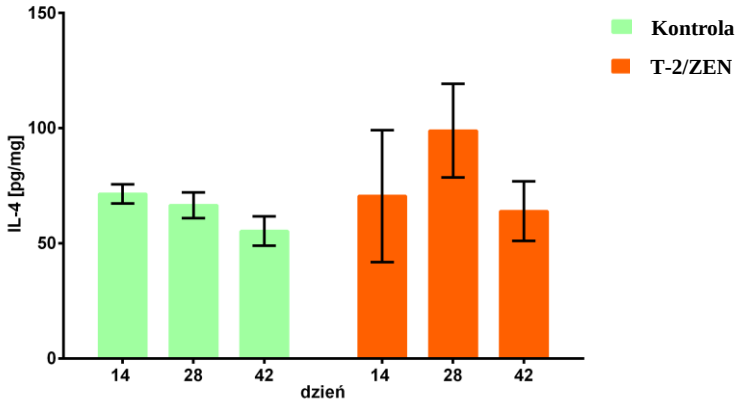


Ryc. 8. Średnie stężenie IL-12/23p40 w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy p<0,05.

5.2. Cytokiny przeciwzapalne i regulatorowe

5.2.1. Interleukina 4 (IL-4)

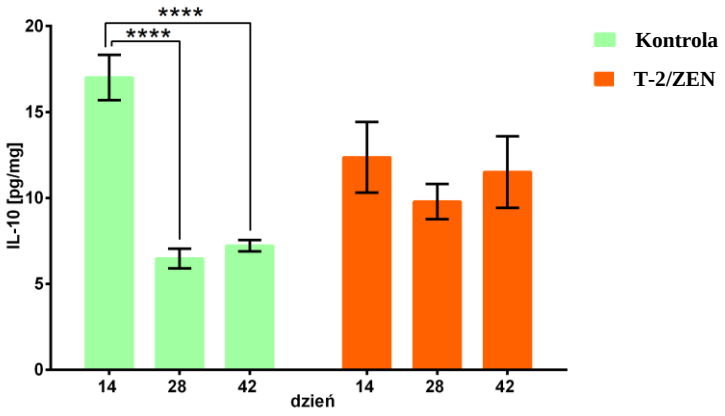
W przypadku wydzielania IL-4 w ścianie jelita biodrowego grupy kontrolnej (Ryc. 9) wykazano lekką tendencję spadkową bez statystycznych różnic pomiędzy średnimi wartościami, które wyniosły odpowiednio 72,4 ± 4,30 pg/mg (dzień 14), 67,50 ± 5,80 pg/mg (dzień 28) i 56,30 ± 6,50 pg/mg (dzień 42). W grupie otrzymujące toksynę T-2 i ZEN (Ryc. 9) poziom wydzielania również nie wykazywał zmian istotnych statystycznie, natomiast w 28 dniu narażenia stężenie wzrosło do 98,94 ± 20,32 pg/mg i było wyższe o ok. 30% w porównaniu do 14 i 42 dnia doświadczenia.



Ryc. 9. Średnie stężenie IL-4 w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.2.2. Interleukina 10 (IL-10)

Średnie wydzielanie IL-10 w ścianie jelita biodrowego grupy kontrolnej (Ryc. 10) zawarło się w przedziale wartości od 17,00 ± 1,30 pg/mg (dzień 14) do 6,50 ± 0,60 pg/mg. (dzień 28). 28 i 42 dzień charakteryzował się istotnym statystycznie spadkiem wydzielania IL-10 w stosunku do 14 dnia doświadczenia ($p<0,0001$). W grupie doświadczalne nie odnotowano zmian statystycznie istotnych, natomiast w porównaniu do grupy kontrolnej w 14 dniu eksperymentu wydzielanie IL-10 było niższe o ok. 26 %, a w 28 i 42 dniu narażenia wyższe odpowiednio o ok. 33 % i ok. 37 % (Ryc. 10).

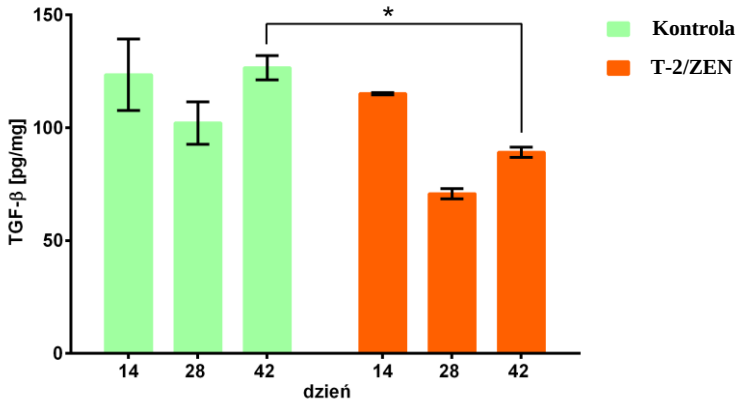


Ryc. 10. Średnie stężenie IL-10 w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. **** – różnica statystycznie istotna przy $p<0,0001$.

5.2.3. Transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-β)

Zestawiając wartości wydzielanego TGFß w ścianie jelita biodrowego loszek, grupa kontrola charakteryzowała się wyższymi wartościami, które wynosiły odpowiednio 123,50 ± 15,79 pg/mg (dzień 14), 102,10 ± 9,43 pg/mg (dzień 28) i 126,60 ± 5,43 pg/mg (dzień 42). Najniższe stężenie w grupie doświadczalnej odnotowano w 28 dniu badania (70,79 ± 2,31 pg/mg), a pozostałe wynosiły 115,10 ± 0,49 pg/mg (dzień 14) i 89,11 ± 2,26 pg/mg

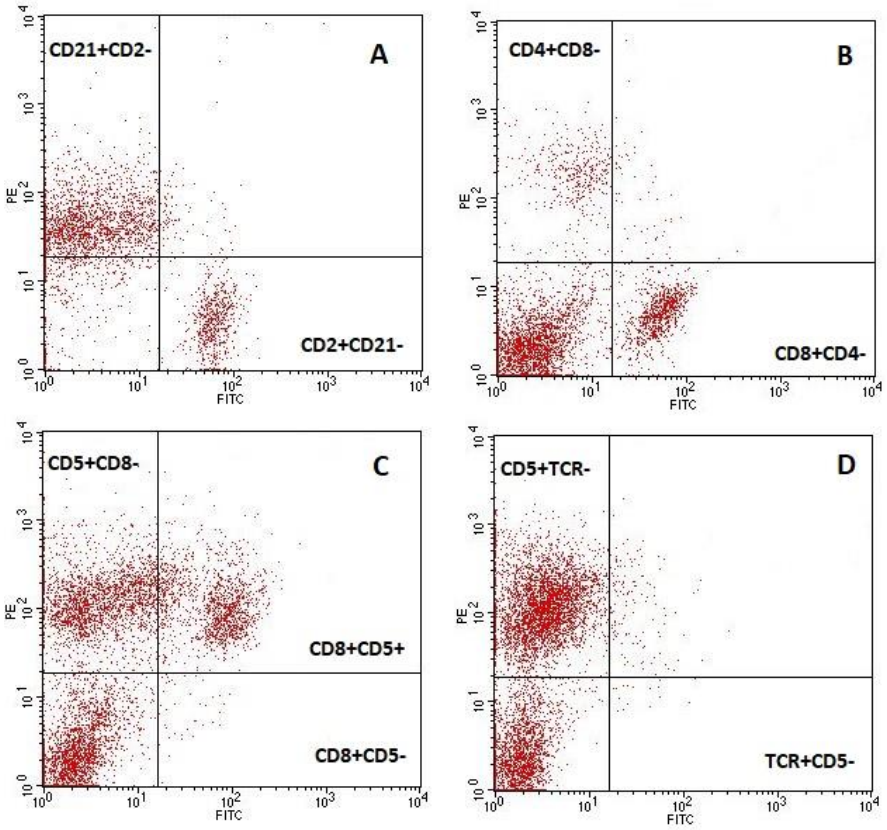
(42 dzień), które było statystycznie niższe w porównaniu do wartości zmierzonej w analogicznym terminie w grupie kontrolnej ($p<0,05$) (Ryc. 11).



Ryc. 11. Średnie stężenie TGFß w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy $p<0,05$.

5.3. Subpopulacje limfocytów T

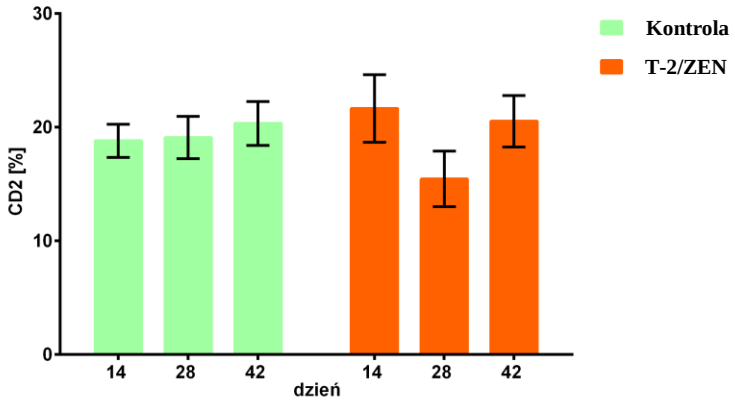
Analizę cytometrii przepływowej przeprowadzono przy użyciu cytometru przepływowego FACSCalibur i programu Cell QuestTM (BectonDickinson, USA). Z każdej próbki pobrano 10 000 komórek. Limfocyty bramkowano na podstawie wykresów punktowych obszaru FSC (FSC-H) vs. SSC-high (SSC-H), a subpopulacje limfocytów zidentyfikowano na podstawie intensywności fluorescencji statystyk kwadrantu na wykresie kropkowym. Reprezentatywne wykresy dot-plots przedstawiające subpopulacje limfocytów pokazano na Ryc. 12.



Ryc. 12. Reprezentatywne wykresy dot-plots subpopulacji limfocytów: (A) limfocyty T-CD2+ i limfocyty B-CD21+; (B) limfocyty Th- CD4+CD8- i Tc- CD8+ CD4-; (C) CD8+ CD5- to komórki NK; (D) CD5+TCR+ to limfocyty TCRαβ, a CD5-TCR+ to limfocyty TCRγδ.

5.3.1. Limfocyty T CD2+

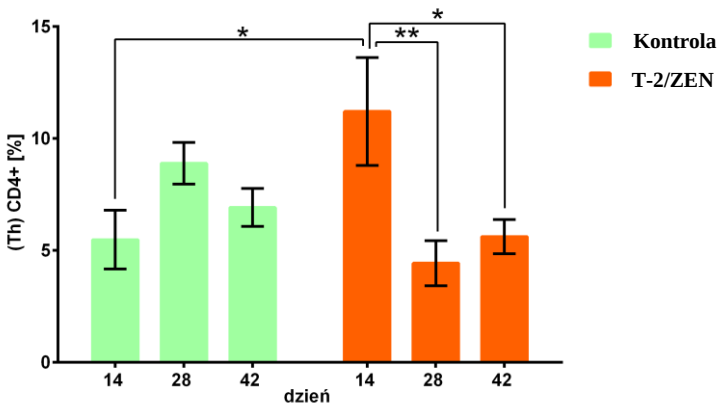
W czasie 6 tygodni trwania eksperymentu średni odsetek subpopulacji limfocytów T CD2+ zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej nie wykazywał różnic istotnych statystycznie. Odsetek komórek T CD2+ w grupie kontrolnej wzrastał od wartości 18,82 ± 1,45 (dzień 14) do 20,35 ± 1,93 (dzień 42). Okres 28 dni narażenia na toksynę T-2 i ZEN wywołał nieistotny statystycznie spadek odsetka komórek T CD2+ z wartości 21,66 ± 2,97 (dzień 14) do 15,45 ± 2,44. W 42 dniu doświadczenia odsetek komórek ponownie wzrósł do poziomu 20,53 ± 2,27 (Ryc. 13).



Ryc. 13. Średni odsetek limfocytów T CD2+ w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono, jako średnia ± SEM.

5.3.2. Limfocyty T CD4+

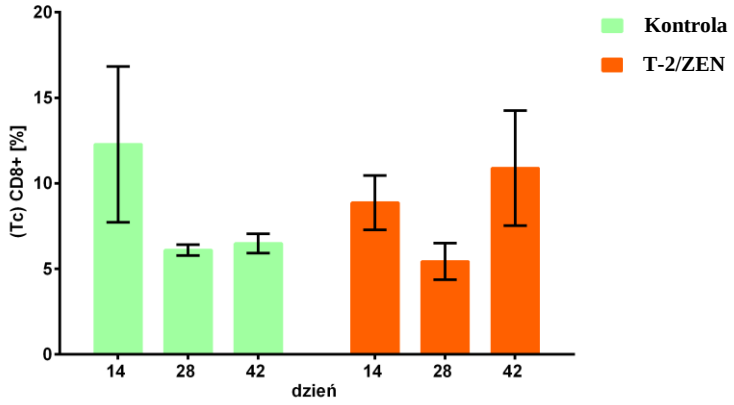
Odsetek limfocytów pomocniczych, Th CD4+ w grupie kontrolnej zawierał się w przedziale wartości 5,54 ± 1,38 (dzień 14) do 8,82 ± 0,94 (dzień 28). W 42 dniu eksperymentu uległ obniżeniu, ale pozostał na poziomie wyższym w porównaniu do 14 dnia badania (6,87 ± 0,82). W grupie loszek narażonych na łączne działanie toksyny T-2 i ZEN najwyższy odsetek limfocytów wystąpił w 14 dniu eksperymentu (11,21 ± 2,41) i była to statystycznie wyższa wartości od tej jaki odnotowano w grupie kontrolnej ($p<0.05$). Odpowiednio w 28 i 42 dniu narażenia odsetki spadły istotnie statystycznie do poziomu 4,43 ± 1,02 ($p<0,01$) i 5,62 ± 0,76 ($p<0,05$) w porównaniu do dnia 14 (Ryc. 14).



Ryc. 14. Średni odsetek limfocytów T CD4+ (pomocniczych, Th) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy p<0,05; ** – różnica statystycznie istotna przy p<0,01.

5.3.3. Limfocyty T CD8+

Odsetek limfocytów cytotoksycznych T CD8+ w grupie kontrolnej przyjął tendencję malejącą nie wykazując przy tym zmian istotnych statystycznie i zawierał się w przedziale wartości od 12,30 ± 4,45 (dzień 14) do 6,11 ± 0,35 (dzień 28). W grupie narażonej na połączone działanie toksyny T-2 i ZEN również nie zaobserwowano różnic istotnych statystycznie, ale poza obniżonym odsetkiem komórek wartość wzrosła z 8,87 ± 1,59 (dzień 14 do 10,8 ± 3,36 (dzień 42) (Ryc. 15).

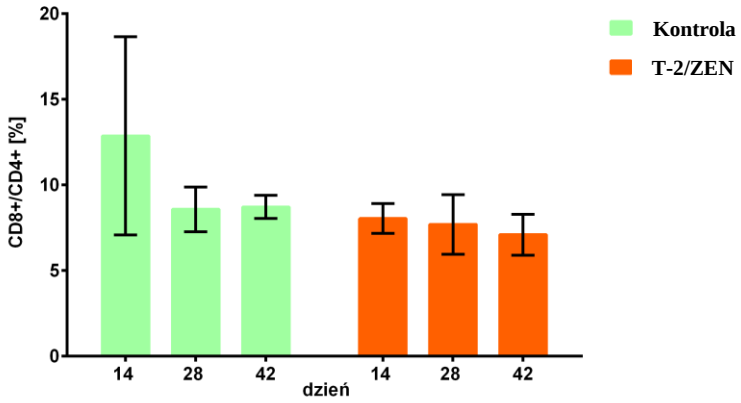


Ryc. 15. Średni odsetek limfocytów T CD4-8+ (cytotoksycznych, Tc) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.3.4. Limfocyty T CD4+CD8+

Odsetek komórek podwójnie pozytywnych T CD4+CD8+ w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej i doświadczalnej wykazywał tendencję spadkową od 12,92 ± 5,90 (dzień 14), przez 8,61 ± 1,20 (dzień 28) do 8,80 ± 0,65 (dzień 42). W grupie loszek narażonych na jednoczesne podawanie toksyny T-2 i ZEN bezwzględne wartości

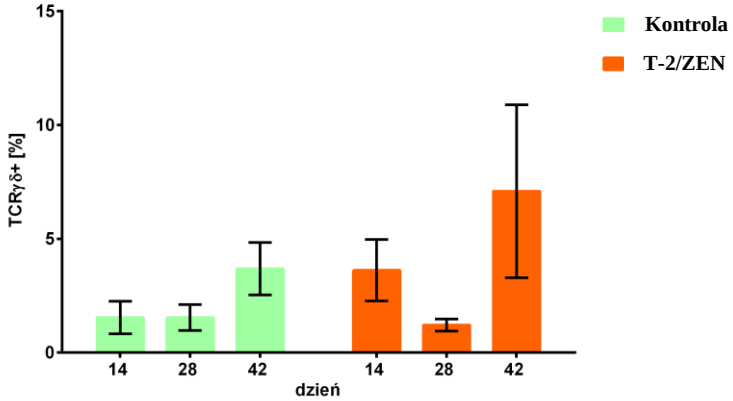
odsetka populacji limfocytów były nieznacznie niższe w porównaniu do grupy kontrolnej i wynosiły 8,04 ± 0,87 (dzień 14), 7,70 ± 1,74 (dzień 28) do 7,10 ± 1,20 (dzień 42). W obu grupach nie odnotowano różnic istotnych statystycznie (Ryc. 16).



Ryc. 16. Średni odsetek limfocytów T CD4+CD8+ w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.3.5. Limfocyty TCRγδ+

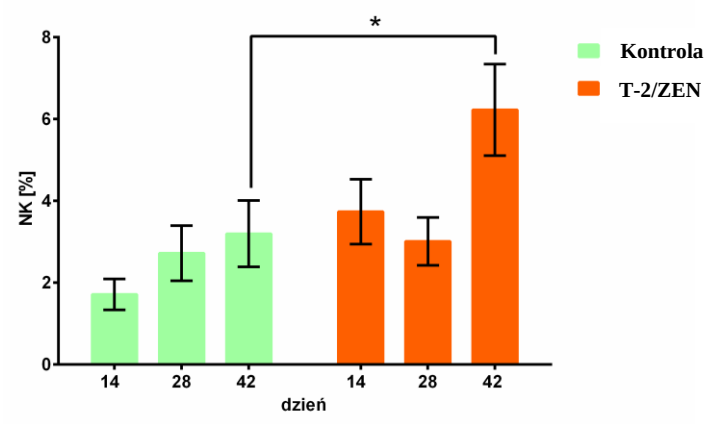
Odsetek limfocytów Tγδ o markerze powierzchniowym TCR+ w grupie kontrolnej w przebiegu doświadczania przybrał tendencję wzrostową, nie wykazując różnic istotnych statystycznie przyjmując następujące wartości liczbowe 1,58 ± 0,74 (dzień 14), 1,47 ± 0,63 (dzień 28) i 3,71 ± 1,21 (dzień 42). W ścianie jelita biodrowego grupy zwierząt narażonych na jednoczesne podawanie toksyny T-2 i ZEN odsetek limfocytów Tγδ był wyższy od wartości oznaczonej w grupie kontrolnej wynosząc odpowiednio 3,62 ± 1,35 i 7,09 ± 3,80, natomiast w 28 dniu podawania był niższy i wyniósł 1,21 ± 0,26. Pomiędzy ocenianymi terminami eksperymentu nie wystąpiły pomiędzy grupami różnice istotne statystycznie (Ryc. 17).



Ryc. 17. Średni odsetek limfocytów Tγδ (TCRγδ+) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.3.6. Limfocyty NK

Odsetek limfocytów NK o markerze powierzchniowym CD5-CD8+ (NK) w grupie kontrolnej przybrał tendencję wzrastającą i wyniósł 1,73 ± 0,37 (dzień 14), 2,72 ± 0,66 dzień 28) i 3,22 ± 0,82 (dzień 42). W grupie loszek narażonych na łączne działanie toksyny T-2 i ZEN oznaczony odsetek limfocytów NK w 14, 28 i 42 dniu podawania były wyższe w porównaniu z grupą kontrolną wynosząc odpowiednio 3,73 ± 0,78, 3,03 ± 0,61 i 6,26 ± 1,13 ($p<0,05$) (Ryc. 18).

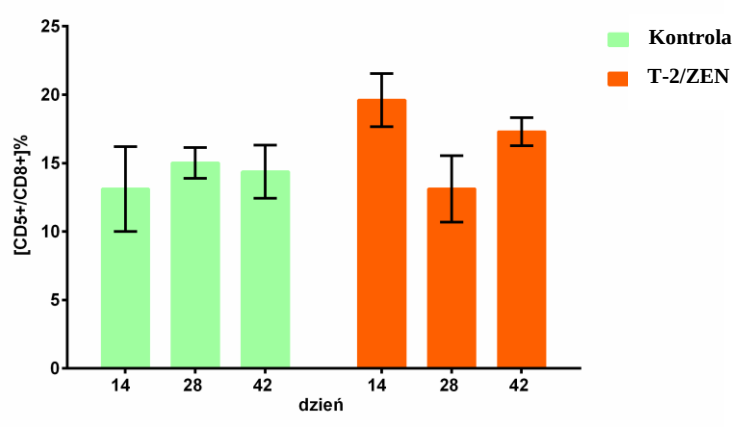


Ryc. 18. Średni odsetek limfocytów CD5-CD8+ (NK) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy $p<0,05$.

5.3.7. Limfocyty śródnabłonkowe TCR αß+ z restrykcją MHC

W czasie 42 dni trwania eksperymentu średni odsetek subpopulacji limfocytów T CD5+CD8+ określanych jako progenitorowe limfocyty T z restrykcją MHC, zarówno w grupie kontrolnej jak i doświadczalnej nie wykazywał różnic istotnych statystycznie. Odsetek komórek T CD5+CD8+ w grupie kontrolnej wzrastał od wartości 13,12 ± 3,09 (dzień 14) do 15,04 ± 1,12 (dzień 28), by następnie nieznaczni esie obniżyć do poziomu 14,40 ± 1,94. W grupie poddanej narażeniu na toksynę T-2 i ZEN poza 28 dniu

doświadczenia obserwowano wyższe odsetki populacji komórek T CD5+CD8+ w odniesieniu do zwierząt z grupy kontrolnej i kształtowały się na poziomie 19,61 ± 1,35 (dzień 14), 13,12 ± 0,26 (dzień 28) i 17,31 ± 3,80 (dzień 42) (Ryc. 19).

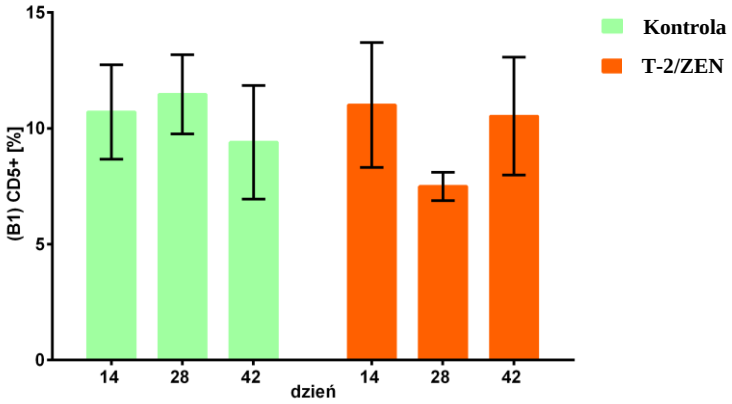


Ryc. 19. Średni odsetek limfocytów CD5+CD8+ (progenitorowe limfocyty T z restrykcją MHC) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.4. Subpopulacje limfocytów B

5.4.1. Limfocyty B1

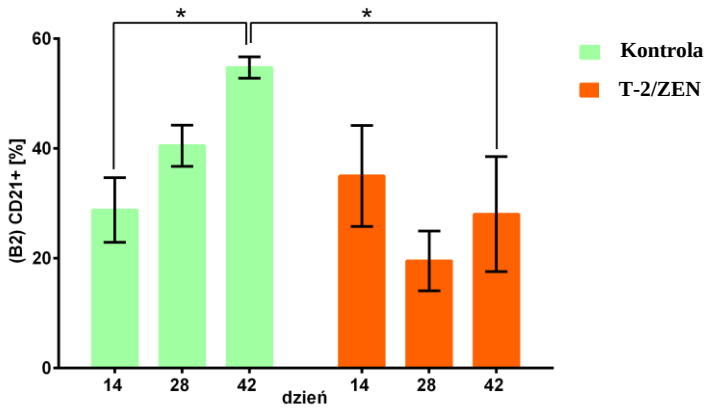
W grupie kontrolnej odsetek limfocytów B CD5+ (B1) do 28 dniu badania miał tendencję wzrostową i wyniósł odpowiednio 10,75 ± 2,06 (dzień 14) i 11,45 ± 1,69 (dzień 28). Z kolei w 42 dniu eksperymentu wartość odsetka spadła poniżej wartości z 14 dnia badania do poziomu 9,53 ± 2,51. Pomiędzy odsetkami kolejnych terminów badań nie wykazano różnic istotnych statystycznie. W grupie zwierząt narażonych na łączne podawanie toksyny T-2 i ZEN odsetek limfocytów B CD5+ (B1) był relatywnie niższy w porównaniu do grupy kontrolnej. W 28 dniu eksperymentu w porównaniu do 14 dnia obniżył się z 11,01 ± 2,69 (dzień 14) do 7,51 ± 0,61 (dzień 28), a wzrósł w 42 dniu eksperymentu do poziomu 10,53 ± 2,54. Podobnie jak w grupie kontrolnej nie zanotowano różnic istotnych statystycznie (Ryc. 20).



Ryc. 20. Średni odsetek limfocytów B CD5+ (B1) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM.

5.4.2. Limfocyty B2

W grupie kontrolnej w kolejnych dniach badania odnotowano wzrost odsetka limfocytów B CD21+ (B2) od 28,85 ± 5,95 (dzień 14) przez 41,00 ± 3,80 (dzień 28) do 54,90 ± 1,90 (dzień 42), która była statystycznie istotnie wyższa w stosunku do 14 dnia eksperymentu grupy kontrolnej ($p<0,05$) (Ryc. 21). Odsetek limfocytów B CD21+ (B2) grupy loszek otrzymujących mieszaninę toksyny T-2 i ZEN był znacząco obniżony poza nieznacznie większym w porównaniu do kontroli w daniu 14 podawania i wyniósł odpowiednio 35,00 ± 9,21 (dzień 14), 19,54 ± 5,46 (dzień 28) i 28,04 ± 10,48 (dzień 42). W 42 dniu narażenia zwierząt na jednoczesne działanie toksyny T-2 i ZEN odsetek limfocytów był statystycznie istotnie niższy w porównaniu do kontroli ($p<0,05$) (Ryc. 21).



Ryc. 21. Średni odsetek limfocytów B CD21+ (B2) w ścianie jelita biodrowego loszek grupy kontrolnej (n=5) i grupy doświadczalnej (n=5). Obliczone wartości przedstawiono jako średnia ± SEM. * – różnica statystycznie istotna przy $p<0,05$.

6. Dyskusja

Spożycie mikotoksyn może powodować ostrą toksyczność lub przewlekłe zaburzenia, w zależności od stężenia i czasu trwania narażenia. U zwierząt gospodarskich może to objawiać się obniżoną wydajnością, odmową przyjmowania paszy, słabą jej konwersją, zmniejszonym przyrostem masy ciała, supresją immunologiczną, zaburzeniami reprodukcji i pozostałościami w produktach żywnościowych pochodzenia zwierzęcego (Obremski i in. 2021).

Wiele mikotoksyn może być wytwarzanych przez jeden gatunek grzyba pleśniowego, a często zdarza się, że surowce paszowe są jednocześnie zanieczyszczone wieloma gatunkami grzybów wytwarzających wiele rodzajów mikotoksyn, które w konsekwencji trafiają do pasz (Jin i in. 2021). W obronie układu pokarmowego przed patogenami niezbędna jest skuteczna obrona immunologiczna, ale te same mechanizmy w odpowiedzi na białka pokarmowe lub bakterie komensaliczne mogą prowadzić do rozwoju szeregu przewlekłych chorób. Tego typu reakcjom zwykle zapobiega złożona gra mechanizmów regulacyjnych funkcjonujących w jelitowym układzie odpornościowym (Mowat 2003).

Jelito cienkie jest najdłuższym organem i to tam odbywa się najważniejsza część trawienia. Składa się ono z trzech zróżnicowanych części: dwunastnicy, jelita czczego i jelita biodrowego, w którym to zachodzi wchłanianie składników odżywczych. Nabłonek jelita cienkiego jest w ciągłym kontakcie z antygenami pokarmowymi, jelitowymi bakteriami komensalnymi i potencjalnymi patogenami, które dostają się do żywiciela wraz z pożywieniem. Obciążenie bakteryjne w jelicie cienkim jest niskie i wzrasta w jego końcowym odcinku (Santaolalla i Abreu 2012). Układ immunologiczny funkcjonujący w obrębie przewodu pokarmowego to wyjątkowe miejsce w organizmie, ponieważ w GALT mieści się około 80% wszystkich komórek odpornościowych organizmu. GALT chroni organizm przed patogenami, ale także zachowuje homeostazę tkanek, aby uniknąć patologii o podłożu immunologicznym w odpowiedzi na bodźce środowiskowe (Mowat 2003). Na to wszystko nakłada się nieustanna współpraca, wręcz symbioza układu odpornościowego i mikroflory jelitowej.

Odsadzenie i kolejne etapy dorastania prosiąt, w tym mająca miejsce zmiana warunków bytowania i zmiana diety z płynnej na stałą, charakteryzuje się wyraźnymi zmianami w funkcjonowaniu GALT. Należy podkreślić, że jest to ważny okres zmian

w proporcjach pomiędzy poszczególnymi populacjami komórek odpornościowych tj. limfocytami T CD4+, limfocytami T CD8+, limfocytami śródnabłonkowymi, komórkami T podwójnie dodatnimi CD4+CD8+, limfocytami B1 i B2, czy wieloma innymi (Wojtacha i in. 2021). W związku z tym ustalenie odpowiedniej liczby i proporcji poszczególnych subpopulacji limfocytów, jak i produkowanych przez nie cytokin stanowi jeden z warunków zachowania homeostazy w całym organizmie. Nabiera to szczególnego znaczenia w przypadku narażenia zwierząt na mikotoksyny.

Cytokiny, które odgrywają znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi immunologicznej i zapalnej są nie tylko produkowane przez limfocyty, komórki dendrytyczne, makrofagi, ale również przez niektóre komórki, które w klasycznym ujęciu nie są zaliczane do układu odpornościowego. Wiadomo, że TGF-α, IL-1, IL-10, IL-15, czy IL-18 są produkowane konstytutywnie przez komórki nabłonka i odgrywają istotną rolę w napływie komórek układu immunologicznego do błony śluzowej jelita, czy pełnią funkcję stymulacyjną we wzroście komórek nabłonka (Onyiah i Colgan 2016).

W obrębie struktur jelita znajdują się miejsca uruchamiania reakcji odpornościowej, określane jako kępki Peyera wraz z limfocytami T, limfocytami B, komórkami dendrytycznymi i makrofagami, które wydzielając cytokiny, tworzą specyficzne środowisko komórkowo-cytokinowe w jelicie (Brandtzaeg i in. 2004, Kobayashi i in. 2019). Ponadto w reakcji aktywacji komórek układu odpornościowego biorą udział także komórki nabłonka jelitowego. W ścianie jelita limfocyty tworzą dwie odrębne fenotypowo populacje komórek, a mianowicie stanowiące 10-30% limfocyty śródnabłonkowe (IEL – intra-epithelial lymphocytes) hamujące reakcje tkanki na antygeny wraz z limfocytami T cytotoksycznymi w stosunku do komórek zakażonych wirusem (Tc) oraz stanowiące 70-90% limfocyty blaszki właściwej błony śluzowej (LPL – lamina propria lymphocytes), głównie limfocyty B i komórki plazmatyczne produkujące głównie dimery IgA oraz komórki pamięci (Mowat 2003).

Po spożyciu zanieczyszczonej w mikotoksyny żywności lub paszy komórki nabłonka jelitowego mogą być narażone na zmienną liczbę mikotoksyn oraz zróżnicowane ich stężenia, a także efekt ich działania synergistycznego czy addytywnego. Skutkiem działania mikotoksyn może być uszkodzenie bariery jelitowej, czy spadek zdolności fagocytarnych makrofagów i komórek dendrytycznych, ale również zmniejszenie humoralnej odpowiedzi immunologicznej jelita (Bouhet i Oswald 2005). W efekcie ta

indukowana mikotoksynami immunosupresja prowadzi do nieodpowiedniej dezaktywacji endotoksyn i silniejszej na nie reakcji zapalnej.

W przeprowadzonym doświadczeniu badaniu poddano końcowy fragment jelita biodrowego zlokalizowany przed zastawką krętniczo-kątniczą. Poddany ocenie odcinek jelita biodrowego w literaturze jest określany jako „terminal ileum". Jest to miejsce, w którym dochodzi m.in. do wzmożonego wchłaniania witaminy B_{12}, soli żółciowych, wody poprzez osmozę, czy lipidów drogą biernej dyfuzji, ale także obszar obecności zwiększonej liczby bakterii, które mogą cofać się z terenu okrężnicy. Dlatego też „terminal ileum" jest bardziej zasobne w układ limfatyczny niż pozostała część jelita biodrowego i stanowi linię obrony przed ewentualnym przedostaniem się drobnoustrojów z obszaru okrężnicy. Niemniej jednak jest to reprezentatywny fragment jelita biodrowego dla oceny lokalnej odpowiedzi immunologicznej całego jelita cienkiego narażonego na toksynę T-2 i ZEN (Wojtacha i in. 2021).

Przeprowadzone badania dotyczyły mało rozpoznanego zagadnienia skutków jednoczesnego narażenia świń na toksynę T-2 i ZEN w niskich dawkach. Przeprowadzony eksperyment polegał na doustnym podawaniu świniom obu mikotoksyn przez okres 42 dni. W dniach 14, 28 i 42 doświadczenia poddano ocenie wybrane parametry immunologiczne ściany jelita biodrowego. Pomiary tkankowego stężenia IL-1β, IL-2, IL-10, IL-12/23p40, IFN-γ i TGF-β wykonano metodą ELISA, a metodą cytometryczną oceniono kształtowanie się w ścianie jelita biodrowego odsetka populacji limfocytów T o markerze powierzchniowym CD2+ (ogólny odsetek limfocytów T), CD4+ (limfocyty pomocnicze Th), CD8+ (limfocyty T cytotoksyczne), CD4+CD8+ (limfocyty T pamięci), CD5-TCR+ (limfocyty śródnabłonkowe TCRγδ+), CD5+CD8+ (TCR αß+, limfocyty śródnabłonkowe T z restrykcją MHC) i CD5-CD8+ (limfocyty NK) oraz odsetka limfocytów B o markerze powierzchniowym CD5+CD8- (komórki B1) i CD21+ (komórki B2) (Tab. 4)

Według schematu zaproponowanego przez Tizarda w układzie odpornościowym funkcjonują dwa podstawowe typy odpowiedzi immunologicznej: (i) odpowiedź zapalna, która aktywuje układ odpornościowy za pośrednictwem IFN-γ, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-6 i IL-17A, a związana z limfocytami pomocniczymi Th lub efektorowymi Tc (Th1, Th17, Tc1, Tc17) oraz (ii) odpowiedź przeciwzapalna i regulacyjna, która hamuje układ odpornościowy, ale jednocześnie indukuje pamięć immunologiczną i procesy tolerancji immunologicznej związane z komórkami pamięci i limfocytami regulatorowymi (Tr1, Treg, iTreg, Tmem, Bmem) za pośrednictwem IL-4, IL-10 i TGF-β (Tizard 2017).

Analizowana przez nas grupa cytokin, określona jako przeciwzapalne i regulatorowe, posiada obydwie wspomniane właściwości, tj. z jednej strony są one cytokinami o funkcji przeciwzapalnej (immunosupresyjne), a z drugiej strony o funkcji regulatorowej. Są one silnie związane z antagonizmem występującym między subpopulacjami limfocytów Th1-Th2 lub makrofagami M1-M2. Ta ich dualna rola jest szczególnie ważna w aspekcie odpowiedzi immunologicznej związanej z GALT.

Zarówno toksyna T-2 jak i ZEN wywołują wiele określonych efektów biologicznych. Dowiedziono, że wykazują zdolność hamowania/blokowania syntezy kwasów nukleinowych, czy białka (Adhikari i in. 2017). Na poziomie komórek odpornościowych takie działania mogą przełożyć się na ilość wydzielanych cytokin, jak również na zmiany w odsetku poszczególnych populacji limfocytów. Zależność wysokości dawki toksyny T-2 jak i innych TCH na stężenie wydzielanych cytokin znajduje swoje odzwierciedlenie w literaturze. Schuhmacher-Wolz i in. podają, że generalnie niskie dawki TCH wyrażone w μg/kg m.c. działają aktywująco na układ immunologiczny, w przeciwieństwie do dawek wysokich wyrażonych w mg/kg m.c., które oddziałują hamująco (Schuhmacher-Wolz i in. 2010). Podobny efekt zaobserwowali Ahmadi i Riazipour hodując *in vitro* mysie otrzewnowe makrofagi oraz komórki pochodzące z węzłów chłonnych, traktując je toksyną T-2 w zakresie stężeń od 0,001 μg/ml do 100 μg/ml (Ahmadi i Riazipour 2008). Stężenia cytokin IL-1β, IL-2, IL-4, IL-10, IL-12, TNFα i IFN-γ rosły przy ekspozycji komórek na stężenie toksyny T-2 poniżej 0,1 μg/ml, w przeciwieństwie do narażenia na stężenie powyżej 1μg/ml (Ahmadi i Riazipour 2008). W pracy Li i in. wykazano również wzrost wydzielania cytokin prozapalnych przez linię komórkową ptasich makrofagów po dawce toksyny T-2 w zakresie od 1 ng do 5 ng/ml (Li i in. 2013).

Podstawową funkcją IL-10 jest działanie immunosupresyjne, ale także wspomaganie wydzielania IgA w błonach śluzowych (Komai i in. 2018). To właśnie śluzówkowe IgA chroni nabłonek jelit przed ksenobiotykami, wirusami i bakteriami, a także utrzymuje homeostazę środowiska jelitowego (Kato i in. 2014). Jednak jak zbadano, wpływ ZEN na syntezę IgA jest zmienny, ponieważ podawanie ZEN samicom myszy BALB/c przez dwa tygodnie w dawce 5 lub 20 mg/kg m.c. spowodowało istotny spadek poziomu przeciwciał IgA w śluzówce dwunastnicy myszy (Islam i in. 2017), a z drugiej strony podanie 20 mg ZEN/kg m.c. tylko przez jeden tydzień samcom myszy BALB/c istotnie zwiększało poziom IgA w treści jelita czczego (Wang i in. 2017). Chociaż w obu eksperymentach

zastosowano to samo stężenie ZEN (20 mg/kg m.c.) i ten sam sposób podawania (doustny zgłębnik) to różne wyniki mogą być związane z czasem trwania eksperymentu (jeden tydzień vs. dwa tygodnie) lub mogą zależeć od płci zwierząt (samiec vs. samica), czy badanego odcinka jelita (dwunastnica vs. jelito czcze).

Obserwowane w ścianie jelita biodrowego zmiany stężeń wydzielanych cytokin są najistotniejszym obrazem wpływu mikotoksyn na aktywność GALT. Prozapalne właściwości niektórych z nich mogą być w tym wypadku szczególnie ważne ze względu na ich potencjalny patologiczny wpływ na badany odcinek jelita biodrowego. W przeprowadzonym eksperymencie zawartość IFN-γ była odwrotnie proporcjonalna w grupie badanej w stosunku do kontroli, rosła przez cały eksperyment w przypadku zwierząt traktowanych mieszanką toksyny T-2 i ZEN (Ryc. 5). Wiadomo, że IFN-γ jest związany z odpowiedzią immunologiczną komórkową nazywaną również odpowiedzią typu I. Cytokina jest wydzielana przede wszystkim przez limfocyty Th1, Tc1 (w pracy oznaczone jako limfocyty T CD8+), komórki NK a także przez komórki ILC 1 (Kak i in. 2018). Wydzielany w jelitach IFN-ɣ jest powiązany z IL-12 i makrofagami M1 aktywowanymi klasycznie m.in. przez LPS (Greving i Towne 2019, Chikano i in. 2000). Działanie IFN-γ polega na aktywacji układu immunologicznego oraz działaniu przeciwnowotworowym i przeciwwirusowym. W przeprowadzonym w naszym przypadku doświadczeniu narażenia świń na toksynę T-2 i ZEN, podwyższony poziom IFN-γ w jelicie biodrowym może wskazywać na możliwość zwiększonej przepuszczalności nabłonka jelitowego (Beaurepaire i in. 2009) i w konsekwencji aktywację makrofagów przez antygeny bakteryjne pochodzące ze światła jelita. Należy jednak zwrócić uwagę, że w tym wypadku komórkami, które są źródłem tej cytokiny mogą być limfocyty Th oraz Tc, co jednak nie oznacza, że to może być związane ze zwiększeniem ich odsetka Ryc. 14 i Ryc. 15. W puli wymienionych limfocytów egzystują nie tylko typowi producenci IFN-γ, czyli wspomniane wcześniej limfocyty Th1, czy Tc1, ale również takie które odpowiedzialne są za syntezę innych cytokin np. IL-4, IL-10, czy nie zmierzonej w naszym eksperymencie IL-17 (Geginat i in. 2014, Kak i in. 2018, Walrath i in. 2020).

IL-4 pełniąca, jak wcześniej wspomniano funkcje przeciwzapalne i regulatorowe (Lewko i Oldham 2009, Tizard 2017), wydzielana jest przede wszystkim przez limfocyty Th2, ale także przez nieswoiste komórki limfoidalne inaczej określane, jako naturalne komórki limfoidalne (ILC2 – Innate lymphoid cells 2). Ponadto IL-4 jest silnie związana z odpowiedzią regulacyjną makrofagów M2 oraz działa antagonistycznie w stosunku do

funkcji limfocytów Th1 i IFN-γ oraz zmniejsza ostrą odpowiedź zapalną. IL-4 zmniejsza również polaryzację makrofagów w kierunku M1 (He i in. 2020), jednak również wiąże się z odpowiedzią przeciwpasożytniczą. Zjawisko to jest często określane w literaturze jako odchylenie immunologiczne/polaryzacja immunologiczna (Lewko i Oldham 2009, Chen i in. 2019). W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowaliśmy wzrost jej wydzielania w 28. dniu eksperymentu (Ryc. 9), jako wyraz reakcji na wydzielanie IFN- γ (Ryc. 5), a jeszcze bardziej na IL-1ß (Ryc. 6).

Kolejną cytokiną aktywującą komórki układu immunologicznego jest IL-2. Jej rosnący poziom (Ryc. 7) świadczyć może o wzrastającej proliferacji limfocytów T. Należy również mieć na uwadze, że IL-2 jest niezbędna do ich przeżycia. Działanie limfocytów T regulatorowych (Treg FOXP3) zarówno tych grasiczozależnych, jak i indukowalnych jest również zależna od IL-2. Jednak najbardziej istotne działanie tej cytokiny wiąże się z limfocytami Th-1 i produkcją IFN-γ. Cytotoksyczne właściwości tej drugiej często wiążą się z jej działaniem proapoptycznym na inne komórki w tym również komórki układu immunologicznego. Należy zauważyć, że w powyższych badaniach zanotowano spadek odsetka limfocytów B2 (CD21+), co mogło być skutkiem działania IFN-γ (Ryc. 21).

Wśród cytokin prozapalnych, których poziom w ścianie jelita biodrowego wzrastał przez cały czas eksperymentu jest IL-1β. Cytokina ta może być wydzielana przez większość komórek, w tym również przez te nie będące składowymi układu immunologicznego. Toteż oprócz różnych subpopulacji makrofagów i limfocytów, w jelicie biodrowym może być ona wydzielana m.in. przez enterocyty (Lopez-Castejon i in. 2011). Badania Kankkunen i in. wykazały aktywację wydzielania cytokin prozapalnych przez ludzkie makrofagi pod wpływem trichotecenów, do których przecież zalicza się toksynę T-2 (Kankkunen i in. 2009). IL-1β wytwarzana jest na skutek aktywacji inflammasomu, specyficznej struktury białkowej inicjującej stan zapalny pod wpływem stymulacji receptorów TLR i NLR (Lei-Leston i in. 2017). Jej aktywacja może być również inicjowana poprzez działanie mikotoksyn na enterocyty. Działanie toksyny T-2 polega na blokowaniu syntezy RNA, w tym także rRNA. W literaturze opisuje się procesy, w których bezpośrednie działanie toksyny T-2 i deoksyniwalenolu powoduje fragmentację 28S rRNA oraz 18S rRNA (Zhou i in. 2005). Często ten proces jest nazywany depurynacją i prowadzi do upośledzenia tworzenia rybosomów. Wiązanie z rybosomem prowadzi do aktywacji kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK – ang. mitogen-activated protein kinases), które biorą udział w procesach, takich jak wzrost komórek, proliferacja

i apoptoza (Vatzia i in. 2019), co w konsekwencji może skutkować działaniem immunostymulującym lub immunosupresyjnym (Zhou i in. 2005, Bae i Pestka 2008). Powstałe w ten sposób krótkie odcinki RNA indukują odpowiednią kinazę – PKR, kinazę białkową zależną od RNA. Trichoteceny indukują również RNA-zy w tym przede wszystkim RNazę L, RNazę 6. Stan wywołany przez toksynę T-2 lub deoksynivalenol nazywany jest z literaturze syndromem stresu rybotoksycznego i powoduje wzrost ekspresji genów związanych ze stanem zapalnym, w tym m. in genu kodującego IL-1β (Shifrin i Anderson 1999). Jednocześnie obie mikotoksyny zakłócają naturalne właściwości nabłonka jelitowego, takie jak tworzenie się połączeń barierowych przez kaludyny (np. klaudyna III i IV) oraz syntezę immunologicznych czynników indukujących reakcję tolerancji na antygeny pokarmowe pochodzące ze światła jelita w postaci TGF-β oraz limfopoetyny zrębu grasicy (TSLP – Thymic stromal lymphopoietin) (Nakayama i in. 2018). TGF-β i TSLP tworzą środowisko dla różnicowania się limfocytów Treg – w tym wypadku indukowalnych iTreg, często również nazywanych limfocytami pomocniczymi Th3 (Zeuthen i in. 2007). W przeprowadzonych badaniach stężenie TGF-β spadło po 42 dniach eksperymentu co wskazuje, że prawdopodobnie zakłócone zostały właściwości regulatorowe (Ryc. 11). Jednocześnie spadek TGF-β może sugerować spadek syntezy IgA, odpowiedzialnej odporność nabłonkową, a wydzielanej m.in. z kępek Payera do światła jelita. Zwraca uwagę fakt, że jednocześnie w trakcie eksperymentu zaobserwowano obniżony odsetek limfocytów B2 w jelicie biodrowym świń narażonych na toksynę T-2 i ZEN. Komórki immunokompetentne pod wpływem stymulacji TGF-β syntetyzują IgA (Bondy i Pestka, 1991, Pestka, 2010) poprzez indukcję przełączania syntezy immunoglobulin. Produkowane przez limfocyty B w jelitach immunoglobuliny to następny czynnik barierowy, dający szczelność nabłonka i warunkujący fizjologiczną pracę jelita, a ograniczany przez mikotoksyny.

Inną przyczyną, która może mieć wpływ na zakłócenie funkcji nabłonka jelitowego i podwyższenie wydzielania IL-1β (Gao i in. 2020) jest indukowany przez obie zastosowane w eksperymencie mikotoksyny stres oksydacyjny (Hou i in. 2013, Mavrommatis i in. 2021). Literatura donosi, że zarówno ZEN jak również toksyna T-2 blokując reakcje w łańcuchu oddechowym (klasyczne oddziaływanie trichotecenów) mogą generować tworzenie reaktywnych form tlenu, w tym anionorodnika ponadtlenkowego ($O_2^{\bullet-}$). Toksyna T-2 powoduje hamowanie enzymów cyklu kwasów trójkarboksylowych, a zwłaszcza dehydrogenazy bursztynianowej (Adhikari i in. 2017). Powoduje to

kumulowanie się kwasu bursztynowego, który stabilizuje czynnik hipoksji HIF1α (ang. hypoxia-inducible factor 1) indukujący stan zapalny oraz wydzielanie IL-1β (Ryc. 6). W dalszej kolejności anionorodnik ponadtlenkowy powoduje peroksydację lipidów membran komórkowych, a także składników białkowych. Prowadzi to do powstania związków karbonylowych m.in. malonylodwualdehydu, trans-hydroksynonenalu czy karbonylowych związków białkowych (Ayala i in. 2014), które modyfikując struktury wewnątrzkomórkowe powodują powstanie struktur molekularnych związanych z uszkodzeniem tzw. DAMP (ang. Damage Associated Molecular Patterns), które mogą reagować z wewnątrzkomórkowymi receptorami rozpoznającymi wzory molekularne (PRR – Pattern Recognition Receptors,), indukując w ten sposób reakcje zapalne.

W skład bariery jelitowej oprócz bariery fizycznej nabłonka wchodzi również bariera chemiczna złożona z mucyn wydzielane przez komórki kubkowe mucyny (MUC1, MUC2, MUC3), tworząc żel (Howitt i in. 2016), na którą jak wskazują wyniki badań mają wpływ mikotoksyny. Przykładowo DON zmniejsza ekspresję mucyn w komórkach kubkowych (Pinton i in. 2015).

Mikotoksyny ze względu na działanie antybiotyczne, mogą zmniejszać populacje wielu istotnych gatunków bakterii w przewodzie pokarmowym np. *Lactobacillus* sp. (Ragoubi i in. 2021). Ponadto zarówno toksyna T-2 jak i ZEN zaburzają syntezę białka co może powodować obniżenie poziomu białek istotnych dla ciągłości nabłonka jelitowego np. połączeń ścisłych pomiędzy enterocytami. Zmiany patologiczne wywołane różnymi czynnikami środowiskowymi mogą zaburzyć barierę i spowodować wydzielanie cytokin prozapalnych przez lokalne komórki układu immunologicznego. W przeprowadzonych badaniach odnotowano podwyższony poziom IFN-γ oraz IL-1β. Według literatury (Kaminsky i in. 2021) obie wymienione cytokiny mają wydatny wpływ na stan nabłonka jelitowego. Powodują wzrost przepuszczalności jelitowej, indukując endocytozę nabłonkowych połączeń ścisłych poprzez szlak sygnałowy RhoA/ROCK. Działanie IFN-γ powoduje mikropinocytozę białek połączeń ścisłych, w tym okludyny, białek JAM (junctional adhesion molecule), czy klaudyny 1. Proces ten zależny jest od łańcucha lekkiego miozyny (MLC, myosin light chain) i jego kinazy MLCK (myosin light chain kinase) (Al-Sadi i in. 2009, Capaldo i Nusrat 2009).

W przypadku IL-1β należy także wziąć pod uwagę wpływ tej cytokiny na transportery sodu w nabłonku jelitowym – transporter Na+/H+, spowalniając transport

sodu do wnętrza enterocytów (Das i in. 2018). Stan ten powoduje odwrócenie przepływu wody w ścianie jelita i jest odpowiedzialny za wystąpienie biegunki.

Inne cytokiny takie jak IL-4, IL-10 oraz TGF-β, odpowiedzialne są za różnicowanie się komórek nabłonka, wydzielanie śluzu, a także naprawę nabłonka jelitowego. TGFβ jest wydzielany w dużych ilościach głównie przez subpopulacje komórek regulatorowych i przyjmuje się, że TGFβ odpowiada za tolerancję pokarmową (Johnston i in. 2015). Stwierdzono, że TGFβ jest również wydzielany przez enterocyty (Di Sabatino i in. 2008) i indukuje tworzenie się komórek iTreg oraz stymuluje wydzielanie IgA. Właściwości regulacyjne TGFβ obejmują również proces przełączania przeciwciał z IgG na IgA (Sanjabi i in. 2017). Innym aspektem, poza silnym działaniem immunosupresyjnym, jest indukcja przez TGFβ odpowiedzi przeciw infekcyjnej związanej z IL-17, która również stymuluje sekrecję IgA (Tizard 2017). IL-4 (razem z IL-13) indukuje przerost komórek kępkowych w nabłonku jelitowym (Gerbe i in. 2012, Howitt i in. 2016). Pełnią one rolę chemosensoryczną, a także wydzielają IL-25 i są odpowiedzialne za odpowiedź typu Th2 (Gerbe i Jay 2016). IL-10 zmniejsza przepuszczalność bariery jelitowej, w tym przeciwdziała zmianom spowodowanym przez IFN-γ (Nguyen i in. 2021). To właśnie cytokina IL-10, której podstawową funkcją jest działanie immunosupresyjne, ale także wspomaganie wydzielania IgA w błonach śluzowych (Komai i in. 2018) jest określana jako cytokina immunoregulacyjna (Lewko i Oldham 2009, Tizard 2017, Chen i in. 2019) i w praktyce IL-10 może być wydzielana przez wszystkie komórki immunokompetentne. Jednak szczególnie duża jej ilość jest uwalniana przez różne subpopulacje limfocytów regulatorowych T (Tr1, nTreg, iTreg). Jej działanie w dużej mierze polega na hamowaniu odpowiedzi immunologicznej oraz wspieraniu regulacji szlaków biochemicznych np. spadku ekspresji szlaków glikolizy (Suzuki i in. 2016), co można dostrzec w utrzymującym się podwyższonym jej wydzielaniu w grupie doświadczalnej w porównaniu do kontroli (Ryc. 10).

7. Wnioski

Toksyna T-2 w dawce 14,5 µg/kg mc/dzień, stanowiąca 50 % dawki LOAEL i ZEN w dawce 10 µg/kg m.c./dzień, równe dawce NOAEL podawane jednocześnie przez co najmniej 14 dni wpływają modulująco na parametry układu immunologicznego jelita biodrowego świni.

Obserwowane zmiany stężeń cytokin w obrębie badanego obszaru jelita biodrowego świadczą o rozwijającym się tam stanie zapalnym, który może przyczyniać się do wzrostu przepuszczalności ściany jelit i zaburzenia w tworzeniu się tolerancji pokarmowej.

Obserwowane w badanych fragmentach ściany jelita biodrowego zmiany odsetka subpopulacji limfocytów T CD2+, T CD4+, T CD8+, Tγδ+, TCR αß+, NK, B CD5+ (B1) i B CD21+(B2) oraz spadek odsetka limfocytów B CD21+(B2) świadczą o nasileniu odpowiedzi komórkowej.

Uzyskane wyniki wskazują, że jednoczesne narażenie na dzienną dawkę toksyny T-2 na poziomie 50 % dawki LOAEL i ZEN w dawce NOAEL wpływają negatywnie na układ immunologiczny końcowego odcinaka („terminal illeum”) jelita biodrowego.

8. Literatura

1. Adhikari M., Negi B., Kaushik N., Adhikari A., Al-Khedhairy A.A., Kaushik N.K., Choi E.H. 2017. T-2 mycotoxin: toxicological effects and decontamination strategies. Oncotarget. 16;8(20): 33933-33952.
2. Ahmadi K., Riazipour M. 2008. Effects of T-2 toxin on cytokine production by mice peritoneal macrophages and lymph node T-cells. Iran J. Immunol. 5 (3): 177-180.
3. Al-Sadi R., Boivin M., Ma T. 2009. Mechanism of cytokine modulation of epithelial tight junction barrier. Front Biosci. (Landmark Ed), 14: 2765-2778.
4. Alshannaq A., Yu J.H. 2017. Occurrence, Toxicity, and Analysis of Major Mycotoxins in Food. Int. J. Environ. Res. Public Health, 13;14(6): 632.
5. Awad W.A., Aschenbach J.R., Setyabudi F.M., Razzazi-Fazeli E., Bohm J., Zentek J. 2007. In vitro effects of deoxynivalenol on small intestinal D-glucose uptake and absorption of deoxynivalenol across the isolated jejunal epithelium of laying hens. Poult. Sci. 86: 15–20.
6. Awad W.A., Aschenbach J.R., Zentek J. 2012. Cytotoxicity and metabolic stress induced by deoxynivalenol in the porcine intestinal IPEC-J2 cell line. J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. 96: 709–716.
7. Awad W.A., Razzazi-Fazeli E., Bohm J., Zentek J. 2008. Effects of B-trichothecenes on luminal glucose transport across the isolated jejunal epithelium of broiler chickens. J. Anim. Physiol Anim. Nutr. 92: 225–230.
8. Ayala A., Muñoz M.F., Argüelles S. 2014. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. Oxid. Med. Cell Longev. 2014: 360438.
9. Bae H.K., Pestka J.J. 2008. Deoxynivalenol induces p38 interaction with the ribosome in monocytes and macrophages. Toxicol. Sci. 105, 59–66.
10. Beaurepaire C., Smyth D., McKay D.M. 2009. Interferon-gamma regulation of intestinal epithelial permeability. J. Interferon Cytokine Res. 29(3): 133-144.
11. Ben Salem I., Prola A., Boussabbeh M., Guilbert A., Bacha H., Abid-Essefi S., Lemaire C. 2015. Crocin and Quercetin protect HCT116 and HEK293 cells from Zearalenone-induced apoptosis by reducing endoplasmic reticulum stress. Cell Stress Chaperones, 20: 927–938.
12. Bennett J.W., Klich M. 2003. Mycotoxins. Clin Microbiol Rev. 16(3): 497-516.

13. Benthem de Grav, X., Saltzmann J., Laurain J., Rodriguez M.A., Molist F., Dänicke S., Santos R.R. 2021. Transmission of Zearalenone, Deoxynivalenol, and Their Derivatives from Sows to Piglets during Lactation. Toxins, 13: 37.
14. Benthem de Grave X., Saltzmann J., Laurain J., Rodriguez M.A., Molist F., Dänicke S., Santos R.R. 2021. Transmission of Zearalenone, Deoxynivalenol, and Their Derivatives from Sows to Piglets during Lactation. Toxins, 13: 37.
15. Bimczok D., Döll S., Rau H., Goyarts T., Wundrack N., Naumann M., Dänicke S., Rothkötter H.J. 2007. The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. Immunobiology 212 (8): 655-666.
16. Bimczok D., Döll S., Rau H., Goyarts T., Wundrack N., Naumann M., Dänicke S., Rothkötter H.J. 2007. The Fusarium toxin deoxynivalenol disrupts phenotype and function of monocyte-derived dendritic cells in vivo and in vitro. Immunobiology 212 (8): 655-666.
17. Bondy G.S., Pestka J.J. 1991. Dietary exposure to the trichothecene vomitoxin (deoxynivalenol) stimulates terminal differentiation of Peyer's patch B cells to IgA secreting plasma cells. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108(3): 520-530.
18. Borutova R., Faix S., Placha I., Gresakova L., Cobanova K., Leng L. 2008. Effects of deoxynivalenol and zearalenone on oxidative stress and blood phagocytic activity in broilers. Arch. Anim. Nutr. 62: 303–312.
19. Bouhet S., Oswald I.P. 2005. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. Vet. Immunol. Immunopathol. 108: 199-209.
20. Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248-254.
21. Braicu C., Selicean S., Cojocneanu-Petric R., Lajos R., Balacescu O., Taranu I., Marin D.E., Motiu M., Jurj A., Achimas-Cadariu P., Berindan-Neagoe I. 2016. Evaluation of cellular and molecular impact of zearalenone and Escherichia coli co-exposure on IPEC-1 cells using microarray technology. BMC Genom. 17: 576.
22. Brandtzaeg P., Pabst R. 2004. Let's Go Mucosal: Communication on Slippery Ground. Trends. Immunol. 25: 570-577.

23. Bulgaru C.V., Marin D.E., Pistol G.C., Taranu I. 2021 Zearalenone and the Immune Response. Toxins, 31; 13(4): 248.
24. Busk Ø.L., Ndossi D., Verhaegen S., Connolly L., Eriksen G., Ropstad E., Sørlie M. 2011. Relative quantification of the proteomic changes associated with the mycotoxin zearalenone in the H295R steroidogenesis model. Toxicon, 58, 533–542.
25. Capaldo C.T., Nusrat A. 2008. Cytokine regulation of tight junctions. Biochim. Biophys. Acta. 1788(4): 864-871.
26. Chang S., Su Y., Sun Y., Meng X., Shi B., Shan A. 2018. Response of the nuclear receptors PXR and CAR and their target gene mRNA expression in female piglets exposed to zearalenone. Toxicon, 151: 111–118.
27. Cheli F., Campagnoli A., Dell'Orto V. 2013. Fungal populations and mycotoxins in silages: from occurrence to analysis. Anim. Feed Sci. Technol. 183: 1–16.
28. Chen X., Song M., Zhang B., Zhang Y. 2016. Reactive Oxygen Species Regulate T Cell Immune Response in the Tumor Microenvironment. Oxid. Med. Cell. Longev. 2016, 1580967.
29. Chen Z., Bozec A., Ramming A., Schett G. 2019. Anti-inflammatory and immune-regulatory cytokines in rheumatoid arthritis. Nat. Rev. Rheumatol. 15 (1): 9-17.
30. Chikano S., Sawada K., Shimoyama T., Kashiwamura S.I., Sugihara A., Sekikawa K., Terada N., Nakanishi K., Okamura H. 2000. IL-18 and IL-12 induce intestinal inflammation and fatty liver in mice in an IFN-gamma dependent manner. Gut, 47(6): 779-786
31. Das S., Jayaratne R., Barrett K.E. 2018. The Role of Ion Transporters in the Pathophysiology of Infectious Diarrhea. Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol. 6 (1): 33-45.
32. Di Sabatino A., Pickard K.M., Rampton D., Kruidenier L., Rovedatti L, Leakey N.A.B., Corazza G.R., Monteleone G., MacDonald T.T. 2008. Blockade of transforming growth factor beta upregulates T-box transcription factor T-bet and increases T helper cell type 1 cytokine and matrix metalloproteinase-3 production in the human gut mucosa. Gut, 57(5): 605-612.
33. Edreva A. 2005. Generation and scavenging of reactive oxygen species in chloroplasts: a submolecular approach. Agric. Ecosyst. Environ. 106: 119–133.
34. EFSA CONTAM Panel (EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain) Scientific Opinion on the risks for human and animal health related to the presence of modified

forms of certain mycotoxins in food and feed. EFSA J. 2014;12:3916. doi: 10.2903/j.efsa.2014.3916

35. EFSA Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM); Scientific Opinion on risks for animal and public health related to the presence of T-2 and HT-2 toxin in food and feed. EFSA Journal 2011; 9(12): 2481, 187 pp.
36. European Commission, 2006. COMMISSION RECOMMENDATION of 17 August 2006 on the Presence of Deoxynivalenol. zearalenone, ochratoxin A, T-2 and HT-2 and fumonisins in products intended for animal feeding [WWW Document]. URL. https ://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32006H0576.
37. European Commission, 2011. COMMISSION REGULATION (EU) No 574/2011 of 16 June 2011 amending Annex I to Directive 2002/32/EC of the European Parliament and of the Council as regards maximum levels for nitrite, melamine. Ambrosia spp. and carry-over of certain coccidiostats and histom [WWW Document]. URL. https ://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32011R0574.
38. European Commission, 2016. COMMISSION RECOMMENDATION (EU) 2016/1319 of 29 July 2016 amending Recommendation 2006/576/EC as regards deoxynivalenol, zearalenone and ochratoxin A in pet food [WWW Document]. URL. https://eur-lex. europa.eu/eli/reco/2016/1319/oj.
39. European Commission. Commission Recommendation (EC) of 27 March 2013 on the Presence of T-2 and HT-2 Toxin in Cereals and Cereal Products (2013/165/EU). Off. J. Eur. Union 2013, L91/12. Available online: https://eur-lex.europa.eu/legalcontent/EN/TXT/?uri=CELEX%3A32013H0165
40. FanW., Lv Y., Ren S., Shao M., Shen T., Huang K., Zhou J., Yan L., Song S. 2018. Zearalenone (ZEA)-induced intestinal inflammation is mediated by the NLRP3 inflammasome. Chemosphere, 190: 272–279.
41. Flemming J., Hudson B., Rand T.G. 2004. Comparison of inflammatory and cytotoxic lung responses in mice after intratracheal exposure to spores of two different Stachybotrys chartarum strains. Toxicol. Sci. 78 (2): 267-275.
42. Fruhauf S., Novak B., Nagl V., Hackl M., Hartinger D., Rainer V., Labudová S., Adam G., Aleschko M., Moll W.D., Thamhesl M., Grenier B. 2019. Biotransformation of the Mycotoxin Zearalenone to its Metabolites Hydrolyzed Zearalenone (HZEN) and Decarboxylated Hydrolyzed Zearalenone (DHZEN) Diminishes its Estrogenicity In Vitro and In Vivo. Toxins (Basel), 20;11(8):481.

43. Gajęcka M., Tarasiuk M., Zielonka Ł., Dąbrowski M. Gajęcki M. 2016 Risk assessment for changes in the metabolic profile and body weights of pre-pubertal gilts during long-term monotonic exposure to low doses of zearalenone (ZEN). Res. Vet. Sci. 109: 169–180.
44. Gao Y., Meng L., Liu H., Wang J., Zheng N. 2020. The Compromised Intestinal Barrier Induced by Mycotoxins. Toxins (Basel). 28;12(10): 619.
45. Geginat J., Paroni M., Maglie S., Alfen J.S., Kastirr I., Gruarin P., De Simone M., Pagani M., Abrignani S. 2014. Plasticity of human CD4 T cell subsets. Front. Immunol. 16;5:630.
46. Gerbe F., Jay P. 2016. Intestinal tuft cells: epithelial sentinels linking luminal cues to the immune system. Mucosal Immunol. 9(6): 1353-1359.
47. Gerbe F., Legraverend C., Jay P. 2012. The intestinal epithelium tuft cells: specification and function. Cell. Mol. Life Sci. 69(17): 2907-1917.
48. Greving C.N.A., Towne J.E. 2019. A Role for IL-12 in IBD after All? Immunity. 20;51(2): 209-211.
49. Groschwitz K.R., Hogan S.P. 2009. Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis. J. Allergy Clin. Immunol. 124: 3–20.
50. Gutleb A.C., Morrison E., Murk A.J. 2002. Cytotoxicity assays for mycotoxins produced by Fusarium strains: a review. Environ. Toxicol. Pharmacol. 11 (3-4): 309-320.
51. He Y., Gao Y., Zhang Q., Zhou G., Cao F., Yao S. 2020. IL-4 Switches Microglia/macrophage M1/M2 Polarization and Alleviates Neurological Damage by Modulating the JAK1/STAT6 Pathway Following ICH. Neuroscience, 437: 161-171.
52. Hou Y.J., Zhao Y.Y., Xiong B., Cui X.S., Kim N.H., Xu Y.X., Sun S.C. 2013. Mycotoxin-containing diet causes oxidative stress in the mouse. PLoS One, 8(3): e60374.
53. Howitt M.R., Lavoie S., Michaud M., Blum A.M., Tran S.V., Weinstock J.V., Gallini C.A., Redding K., Margolskee R.F., Osborne L.C., Artis D., Garrett W.S. 2016. Tuft cells, taste-chemosensory cells, orchestrate parasite type 2 immunity in the gut. Science, 18;351(6279): 1329-1333.
54. Hussein H.S., Brasel J.M. 2001. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. Toxicology, 167, 101-134.

55. Hymery N., Léon K., Carpentier F.G., Jung J.L., Parent-Massin D. 2009. T-2 toxin inhibits the differentiation of human monocytes into dendritic cells and macrophages. Toxicol. In Vitro, 23 (3): 509-519.
56. Hymery N., Sibiril Y., Parent-Massin D. 2006. In vitro effects of trichothecenes on human dendritic cells. Toxicol. In Vitro, 20 (6): 899-909.
57. Islam M.R., Kim J.W., Roh Y.S., Kim J.H., Han K.M., Kwon H.J., Lim C.W., Kim B. 2017. Evaluation of immunomodulatory effects of zearalenone in mice. J. Immunotoxicol. 14: 125–136.
58. Janik E., Niemcewicz M., Podogrocki M., Ceremuga M., Stela M., Bijak M. 2021. T-2 Toxin—The Most Toxic Trichothecene Mycotoxin: Metabolism, Toxicity, and Decontamination Strategies. Molecules, 26(22): 6868.
59. Jaradat Z.W., Viià B., Marquardt R.R. 2006. Adverse effects of T-2 toxin on chicken lymphocytes blastogenesis and its protection with Vitamin E. Toxicology, 225 (2-3): 90-96.
60. Jia R., LiuW., Zhao L., Cao L. Shen Z. 2020. Low doses of individual and combined deoxynivalenol and zearalenone in naturally mouldy diets impair intestinal functions via inducing inflammation and disrupting epithelial barrier in the intestine of piglets. Toxicol. Lett. 333: 159–169.
61. Jin Y., Chen, Q., Luo S., He L., Fan R., Zhang S., Yang C., Chen Y. 2021. Dual near-infrared fluorescence-based lateral flow immunosensor for the detection of zearalenone and deoxynivalenol in maize. Food Chem. 336: 127718.
62. Johansson M.E.V., Hansson G.C. 2013. Mucus and the Goblet Cell. Dig. Dis. 31: 305–309.
63. Johnston C.J., Smyth D.J., Dresser D.W., Maizels R.M. 2016. TGF-β in tolerance, development and regulation of immunity. Cell. Immunol. 299: 14-22.
64. Joseph R.D., Derbyshire M., Stroka J., Emons H., Anklam E. 2004. Trichothecenes: reference materials and method validation. Toxicol. Lett. 153: 123–132.
65. Kak G., Raza M., Tiwari B.K. 2018. Interferon-gamma (IFN-γ): Exploring its implications in infectious diseases. Biomol. Concepts. 30;9(1): 64-79.
66. Kaminsky L.W., Al-Sadi R., Ma T.Y. 2021. IL-1β and the Intestinal Epithelial Tight Junction Barrier. Front. Immunol. 25;12: 767456.

67. Kankkunen P., Rintahaka J., Aalto A., Leino M., Majuri M.L., Alenius H., Wolff H., Matikainen S. 2009. Trichothecene mycotoxins activate inflammatory response in human macrophages. J. Immunol. 15;182(10): 6418-6425.
68. Karlovsky p., Suman M., Berthiller F., De Meester J., Eisenbrand G., Perrin I., Oswald I.P, Speijers G., Chiodini A., Recker T., Dussort P. 2016. Impact of food processing and detoxification treatments on mycotoxin contamination. Mycotoxin Res. 32:179–205.
69. Kato L.M., Kawamoto S., Maruya, M., Fagarasan S. 2014. Gut TFH and IgA: Key players for regulation of bacterial communities and immune homeostasis. Immunol. Cell Biol. 92, 49–56.
70. Kinchen J., Chen H.H., Parikh K., Antanaviciute A., Jagielowicz M., Fawkner-Corbett D., Ashley N., Cubitt L., Mellado-Gomez E., Attar M., Sharma E., Wills Q., Bowden R., Richter F.C., Ahern D., Puri K.D., Henault J., Gervais F., Koohy H., Simmons A. 2018. Structural Remodeling of the Human Colonic Mesenchyme in Inflammatory Bowel Disease. Cell. 175(2): 372–386.e17.
71. Kobayashi N., Takahashi D., Takano S., Kimura S., Hase K. 2019. The Roles of Peyer's Patches and Microfold Cells in the Gut Immune System: Relevance to Autoimmune Diseases. Front. Immunol. 9; 10: 2345.
72. Komai T., Inoue M., Okamura T., Morita K., Iwasaki Y., Sumitomo S., Shoda H., Yamamoto K., Fujio K. 2018. Transforming Growth Factor-β and Interleukin-10 Synergistically Regulate Humoral Immunity via Modulating Metabolic Signals. Front. Immunol. 14; 9:1364.
73. Königs M., Mulac D., Schwerdt G., Gekle M., Humpf H.U. 2009. Metabolism and cytotoxic effects of T-2 toxin and its metabolites on human cells in primary culture. Toxicology, 258 (2-3): 106-115.
74. Kowalska K., Habrowska-Górczyńska D.E., Piastowska-Ciesielska A.W. 2016 Zearalenone as an endocrine disruptor in humans. Environ. Toxicol. Pharmacol. 48, 141–149.
75. Lahjouji T., Bertaccini A., Neves M., Puel, S., Oswald, I.P., Soler, L. 2020. Acute Exposure to Zearalenone Disturbs Intestinal Homeostasis by Modulating the Wnt/ß-Catenin Signaling Pathway. Toxins, 12: 113.
76. Lei-Leston A.C., Murphy A.G., Maloy K.J.. 2017. Epithelial Cell Inflammasomes in Intestinal Immunity and Inflammation. Front. Immunol. 20;8: 1168.

77. Lewczuk B., Przybylska-Gornowicz B., Gajęcka M., Targońska K., Ziółkowska N., Prusik M., Gajęcki M. 2016. Histological structure of duodenum in gilts receiving low doses of zearalenone and deoxynivalenol in feed. Exp. Toxicol. Pathol. 68: 157–166.
78. Lewko W.M., Oldham R.K. 2009. Cytokines. In: Oldham R.K., Dillman R.O. (eds) Principles of Cancer Biotherapy. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-90-481-2289-9_8 Online ISBN 978-90-481-2289-9
79. Li S.J., Pasmans F., Croubels S., Verbrugghe E., Van Waeyenberghe L., Yang Z., Haesebrouck F., Martel A. 2013. T-2 toxin impairs antifungal activities of chicken macrophages against Aspergillus fumigatus conidia but promotes the pro-inflammatory responses. Avian Pathol. 42: 457-463.
80. Liu F., Cottrell J.J., Furness J.B., Rivera L.R., Kelly F.W., Wijesiriwardana U., Pustovit R.V., Fothergill L.J., Bravo D.M., Celi P., Leury B.J., Gabler N.K., Dunshea F.R. 2016. Selenium and vitamin E together improve intestinal epithelial barrier function and alleviate oxidative stress in heat-stressed pigs. Exp. Physiol. 101: 801-810.
81. Liu M., Gao R., Meng Q., Zhang Y., Bi C., Shan A. 2014. Toxic Effects of Maternal Zearalenone Exposure on Intestinal Oxidative Stress, Barrier Function, Immunological and Morphological Changes in Rats. PLoS ONE, 9: 1–14.
82. Logrieco A., Mule G., Moretti A., Bottalico A. 2002. Toxigenic Fusarium species and mycotoxins associated with maize ear rot in Europe. Eur. J. Plant Pathol. 108: 597-609.
83. Long M., Chen X., Wang N., Wang M., Pan J., Tong J., Li P., Yang S., He J. 2018. Proanthocyanidins Protect Epithelial Cells from Zearalenone-Induced Apoptosis via Inhibition of Endoplasmic Reticulum Stress-Induced Apoptosis Pathways in Mouse Small Intestines. Molecules, 23: 1508.
84. Lopez-Castejon G., Brough D. 2011. Understanding the mechanism of IL-1β secretion. Cytokine Growth Factor Rev. 22(4): 189-195.
85. Magnoli A.P., Poloni V.L., Cavaglieri L. 2019. Impact of mycotoxin contamination in the animal feed industry. Curr. Opin. Food Sci. 29: 99–108.
86. Maragos, C. 2010. Zearalenone occurrence and human exposure. World Mycotoxin J. 3. (4): 369 – 383.

87. Maresca M., Mahfoud R., Garmy N., Fantini J. 2002. The mycotoxin deoxynivalenol affects nutrient absorption in human intestinal epithelial cells. J. Nutr. 132: 2723–2731.
88. Marin D., Motiu M., Taranu I. 2015. Food Contaminant Zearalenone and Its Metabolites Affect Cytokine Synthesis and Intestinal Epithelial Integrity of Porcine Cells. Toxins, 7: 1979–1988.
89. Marin D.E., Taranu I., Burlacu R., Manda G., Motiu M., Neagoe I., Dragomir C., Stancu M., Calin L. 2011. Effects of zearalenone and its derivatives on porcine immune response. Toxicol. Vitr. 25: 1981–1988.
90. Marin D.E., Taranu I., Burlacu R., Tudor D.S. 2010. Effects of zearalenone and its derivatives on the innate immune response of swine. Toxicon, 56: 956–963.
91. Mavrommatis A., Giamouri E., Tavrizelou S., Zacharioudaki M., Danezis G., Simitzis P.E., Zoidis E., Tsiplakou E., Pappas A.C., Georgiou C.A., Feggeros K. 2021. Impact of Mycotoxins on Animals' Oxidative Status. Antioxidants (Basel), 1;10(2): 214.
92. McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. Toxins (Basel), 3 (7): 802-814.
93. McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. 2011. Trichothecenes: from simple to complex mycotoxins. Toxins (Basel), 3 (7): 802-814.
94. Medzhitov R., Janeway C.J. 2000. Innate immune recognition: Mechanisms and pathways. Immunol. Rev. 173: 89–97.
95. Meissonnier G.M., Bracarense A.P., Bertin G., Galtier P., Oswald I.P. 2008. Toxic properties of type-A trichothecenes in farm animals. Mycotoxins in farm animals. Eds Oswald IP Taranu I, 131-154.
96. Minervini F., Fornelli F., Lucivero G., Romano C., Visconti A. 2005. T-2 toxin immunotoxicity on human B and T lymphoid cell lines. Toxicology 210 (1): 81-91.
97. Moretti A., Logrieco A.F., Susca A. 2017. Mycotoxins: an underhand food problem. Methods Mol. Biol. 1542: 3–12.
98. Moretti A., Pascale M., Logrieco A.F. 2019. Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe. Trends Food Sci. Technol. 84: 38-40.
99. Mowat A.M., Viney J.L. 1997. The anatomical basis of intestinal immunity. Immunol. Rev 156:145-166.
100. Mowat, A.M. 2003. Anatomical basis of tolerance and immunity to intestinal antigens. Nat. Rev. Immunol. 3: 331-341.

101. Murata H., Sultana P., Shimada N., Yoshioka M. 2003. Structure-activity relationships among zearalenone and its derivatives based on bovine neutrophil chemiluminescence. Vet. Hum. Toxicol. 45: 18–20.
102. Nakayama H., Kitagawa N., Otani T., Iida H., Anan H., Inai T. 2020. Ochratoxin A, citrinin and deoxynivalenol decrease claudin-2 expression in mouse rectum CMT93-II cells. Microscopy (Oxf), 1;67(2): 99-111.
103. Nguyen H.D., Aljamaei H.M., Stadnyk A.W. The Production and Function of Endogenous Interleukin-10 in Intestinal Epithelial Cells and Gut Homeostasis. Cell Mol. Gastroenterol. Hepatol. 12(4): 1343–1352.
104. Obremski K., Gonkowski S., Wojtacha P. 2015a. Zearalenone-induced changes in the lymphoid tissue and mucosal nerve fibers in the porcine ileum. Pol. J. Vet. Sci. 18: 357–365.
105. Obremski K., Trybowski W., Wojtacha P., Gajęcka M., Tyburski J., Zielonka Ł. 2021. The Effect of Zearalenone on the Cytokine Environment, Oxidoreductive Balance and Metabolism in Porcine Ileal Peyer's Patches. Toxins (Basel), 27;12(6): 350.
106. Obremski K., Wojtacha P., Podlasz P., Żmigrodzka M. 2015b. The influence of experimental administration of low zearalenone doses on the expression of Th1 and Th2 cytokines and on selected subpopulations of lymphocytes in intestinal lymph nodes. Pol. J. Vet. Sci. 18: 489–497.
107. Onyiah J.C., Colgan S.P. 2016. Cytokine responses and epithelial function in the intestinal mucosa. Cell. Mol. Life Sci. 73, 4203–4212.
108. Pabst R. 2020. The pig as a model for immunology research. Cell. Tissue Res. 380 (2): 287-304.
109. Pestka J.J. 2007. Deoxynivalenol: Toxicity, mechanisms and animal health risks. Anim. Feed Sci. Tech. 137: 283-298.
110. Pestka J.J. 2010. Deoxynivalenol-induced proinflammatory gene expression: mechanisms and pathological sequelae. Toxins (Basel), 2(6): 1300-1317.
111. Pierron A., Alassane-Kpembi I., Oswald I.P. 2016. Impact of mycotoxin on immune response and consequences for pig health. Anim. Nutr. 2: 63–68.
112. Pinton P., Graziani F., Pujol A., Nicoletti C., Paris O., Ernouf P., Di Pasquale E., Perrier J., Oswald I.P., Maresca M. 2015. Deoxynivalenol inhibits the expression by goblet cells of intestinal mucins through a PKR and MAP kinase dependent repression of the resistin-like molecule β. Mol. Nutr. Food Res. 59(6): 1076-1087.

113. Pinton P., Guzylack-Piriou L., Kolf-Clauw M., Oswald I.P. 2012. The effect on the intestine of some fungal toxins: the trichothecenes. Curr. Immunol. Rev. 8: 193-208.
114. Ragoubi C., Quintieri L., Greco D., Mehrez A., Maatouk I., D'Ascanio V., Landoulsi A., Avantaggiato G. 2021. Mycotoxin Removal by Lactobacillus spp. and Their Application in Animal Liquid Feed. Toxins (Basel), 13(3): 185.
115. Rahman S., Sharma AK, Singh ND, Prawez S. 2021. Immunopathological effects of experimental T-2 mycotoxicosis in Wistar rats. Hum. Exp. Toxicol. 40(5):772-790.
116. Richard J.L. 2007. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-An overview. Int. J. Food Microbiol. 119: 3–10.
117. Rocha O., Ansari K., Doohan F.M. 2005. Effects of trichothecene mycotoxins on eukaryotic cells: a review. Food Addit. Contam. 22 (4): 369-378.
118. Rogowska A. Pomastowski P., Sagandykova G., Buszewski, B. 2019. Zearalenone and its metabolites: Effect on human health, metabolism and neutralisation methods. Toxicon, 162: 46–56.
119. Rogowska A., Pomastowski P., Rafińska K., Railean-Plugaru V., Złoch M., Walczak J., Buszewski B. 2019. A study of zearalenone biosorption and metabolisation by prokaryotic and eukaryotic cells. Toxicon, 169: 81–90.
120. Rosenstein Y., Kretschmer R.R., Lafarge-Frayssinet C. 1981. Effect of Fusarium toxins, T2-toxin and diacetoxyscirpenol on murine T-independent immune responses. Immunology, 44 (3): 555-560.
121. Santaolalla R., Abreu M.T. 2012. Innate immunity in the small intestine. Curr. Opin. Gastroenterol. 28(2): 124-129.
122. Sanjabi S., Oh S.A., Li M.O. 2017. Regulation of the Immune Response by TGF-β: From Conception to Autoimmunity and Infection. Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 1;9(6): a022236.
123. Sergent T., Parys M., Garsou S., Pussemier L., Schneider Y.J., Larondelle Y. 2006. Deoxynivalenol transport across human intestinal Caco-2 cells and its effects on cellular metabolism at realistic intestinal concentrations. Toxicol. Lett. 164 (2): 167-176.
124. Shaw A.C., Joshi S., Greenwood H., Panda A., Lord J.M. 2010. Aging of the innate immune system. Curr. Opin. Immunol. 22: 507–513.

125. Schuhmacher-Wolz U., Heine K., Schneider K. 2010. SCIENTIFIC REPORT submitted to EFSA Report on toxicity data on trichothecene mycotoxins HT-2 and T-2 toxins CT/EFSA/CONTAM/2010/03.
126. Shifrin V.I., Anderson P. 1999. Trichothecene mycotoxins trigger a ribotoxic stress response that activates c-Jun N-terminal kinase and p38 mitogen-activated protein kinase and induces apoptosis. J. Biol. Chem. 14;274(20): 13985-13992.
127. Sudakin D.L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. Toxicol. Lett. 143: 97–107.
128. Suzuki H., Hisamatsu T., Chiba S., Mori K., Kitazume M.T., Shimamura K., Nakamoto N., Matsuoka K., Ebinuma H., Naganuma M., Kanai T. 2016. Glycolytic pathway affects differentiation of human monocytes to regulatory macrophages. Immunol. Lett. 176: 18-27.
129. Taranu I., Marin D.E., Pistol G.C., Motiu M., Pelinescu D. 2015. Induction of pro-inflammatory gene expression by Escherichia coli and mycotoxin zearalenone contamination and protection by a Lactobacillus mixture in porcine IPEC-1 cells. Toxicon, 97: 53–63.
130. Tirado M.C., Clarke R., Jaykus L.A., McQuatters-Gollop A., Frank J.M. 2010. Climate change and food safety: a review. Food Res. Int. 43, 1745–1765.
131. Tizard I. Veterinary Immunology 10th Edition (2017) Paperback ISBN: 9780323523493
132. Twarużek M., Skrzydlewski P., Kosicki R., Grajewski J. 2021. Mycotoxins survey in feed materials and feedingstuffs in years 2015-2020. Toxicon, 202:27-39.
133. Ueno Y. Trichothecenes: overview address. In: Rodricks JV, Hesseltine CW and Mehlman MA (eds) Mycotoxins in human and animal health. Park Forest, IL: Pathotox Publishers, 1977, pp. 189–207.
134. Van Loveren H., Piersma A. 2004. Immunotoxicological consequences of perinatal chemical exposures. Toxicol. Lett. 149 (1-3): 141-145.
135. Vancamelbeke M., Vermeire S.2017. The intestinal barrier: A fundamental role in health and disease. Expert Rev. Gastroenterol. Hepatol. 11: 821–834.
136. Wang X., Yu H., Shan A., Jin Y., Fang H., Zhao Y., Shen J., Zhou C., Zhou Y., Fu Y., Wang J., Zhang J. 2018. Toxic effects of Zearalenone on intestinal microflora and intestinal mucosal immunity in mice. Food Agric. Immunol. 29: 1002–1011.

137. Wang P., Sun L., Wang X., Wu Q., Liu A. 2023. Effective protective agents against the organ toxicity of T-2 toxin and corresponding detoxification mechanisms: A narrative review. In Press, Journal Pre-proof, Available online 4 December 2023 https://doi.org/10.1016/j.aninu.2023.12.001
138. Vatzia E, Pierron A, Saalmüller A, Mayer E, Gerner W. 2019. Deoxynivalenol Affects Proliferation and Expression of Activation-Related Molecules in Major Porcine T-Cell Subsets. Toxins (Basel), 11(11): 644
139. Vlata Z., Porichis F., Tzanakakis G., Tsatsakis A., Krambovitis E. 2005. In vitro cytopathic effects of mycotoxin T-2 on human peripheral blood T lymphocytes. Toxicol. Lett. 160: 60-68.
140. Wallace K.L., Zheng L.B., Kanazawa Y., Shih D.Q. 2014 Immunopathology of inflammatory bowel disease. World J. Gastroenterol. 20: 6-21.
141. Walrath T., Malizia R.A., Zhu X., Sharp S.P., D'Souza S.S., Lopez-Soler R., Parr B., Kartchner B., Lee E.C., Stain S.C., Iwakura Y., O'Connor W Jr. 2020. IFN-γ and IL-17A regulate intestinal crypt production of CXCL10 in the healthy and inflamed colon. Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 1;318(3): G479-G489.
142. Wan L.Y., Allen K.J., Turner P.C., El-Nezami H. 2014. Modulation of Mucin mRNA (MUC5AC and MUC5B) Expression and Protein Production and Secretion in Caco-2/HT29-MTX Co-cultures Following Exposure to Individual and Combined Fusarium Mycotoxins. Toxicol. Sci. 139: 83–98.
143. Wang J.J., Wei Z.K., Han Z., Liu Z.Y., Zhu X.Y., Li X.W., Wang K, Yang Z.T. 2019. Zearalenone Induces Estrogen-Receptor-Independent Neutrophil Extracellular Trap Release in Vitro. J. Agric. Food Chem. 67(16): 4588-4594.
144. Wang X., Yu H., Fang H., Zhao Y., Jin Y., Shen J., Zhou C., Zhou Y., Fu Y., Wang R., Li R., Zhang J. 2019. Transcriptional profiling of zearalenone-induced inhibition of IPEC-J2 cell proliferation. Toxicon, 172: 8–14.
145. Wojtacha P., Trybowski W., Podlasz P., Żmigrodzka M., Tyburski J., Polak-Śliwińska M., Jakimiuk E., Bakuła T., Baranowski M., Żuk-Gołaszewska K., Zielonka Ł., Obremski K. 2021. Effects of a Low Dose of T-2 Toxin on the Percentage of T and B Lymphocytes and Cytokine Secretion in the Porcine Ileal Wall. Toxins (Basel), 13(4): 277.

146. Webster J., Weber R.W.S. 2007. Introduction to Fungi. Cambridge University Press Cambridge, New York, Melbourne, Madrid, Cape Town, Singapore, São Paulo pp. 337-348 ISBN-13 978-0-511-27783-2
147. Wu H., Li X., Zhang Z., Ye Y., Chen Y., Wang J., Yang Z., Zhou E. 2023. The release of zearalenone-induced heterophil extracellular traps in chickens is associated with autophagy, glycolysis, PAD enzyme, and P2X1 receptor. Poult. Sci. 102(10):102946.
148. Zhang J., Liu X., Su Y., Li T. 2022. An update on T2-toxins: metabolism, immunotoxicity mechanism and human assessment exposure of intestinal microbiota. Heliyon, 8(8): e10012
149. Zeuthen L.H, Fink L.N., Frokiaer H. 2008. Epithelial cells prime the immune response to an array of gut-derived commensals towards a tolerogenic phenotype through distinct actions of thymic stromal lymphopoietin and transforming growth factor-beta. Immunology, 123 (2): 197-208.
150. Zheng W.L., Wang B.J., Wang L., Shan, Y.P., Zou H., Song R.L., Wang T., Gu J.H., Yuan Y., Liu X.Z., Zhu G.Q., Bai J.F., Liu Z.P., Bian J.C. 2018. ROS-Mediated Cell Cycle Arrest and Apoptosis Induced by Zearalenone in Mouse Sertoli Cells via ER Stress and the ATP/AMPK Pathway. Toxins, 10: 24.
151. Zhou H.R., Jia Q., Pestka J.J. 2005. Ribotoxic stress response to the trichothecene deoxynivalenol in the macrophage involves the SRC family kinase Hck. Toxicol. Sci. 85(2): 916-926.
152. Zhou J., Zhu L., Chen J., Wang W. Zhang R., Li Y., Zhang Q., Wang W. 2020. Degradation mechanism for Zearalenone ring-cleavage by Zearalenone hydrolase RmZHD: A QM/MM study. Sci. Total Environ. 709: 135897.
153. Zinedine A., Soriano J.M., Moltó J.C., Mañes J. 2007. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: An oestrogenic mycotoxin. Food Chem. Toxicol. 45: 1–18.
154. Złoch M., Rogowska A., Pomastowski, P., Railean-Plugaru V., Walczak-Skierska J., Rudnicka J., Buszewski B. 2020. Use of Lactobacillus paracasei strain for zearalenone binding and metabolization. Toxicon, 181: 9–18.