

OCHRATOKSYNA A I AFLATOKSYNA B1 JAKO CZYNNIKI USZKODZENIA KOŚCI I NEURODEGENERACJI POPRZEZ WPŁYW STĘŻEŃ TNF- α I IL-6 NA PROCESY IMMUNOMODULACJI

Agnieszka Radzka-Pogoda^{1,2)}, Radosław Piotr Radzki³⁾, Marek Bieńko³⁾, Jarosław Szponar⁴⁾, Barbara Sokołowska⁵⁾, Anna Kulik⁶⁾, Małgorzata Lewicka⁷⁾, Andrzej Borzęcki¹⁾

¹⁾ Katedra i Zakład Higieny i Epidemiologii, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

²⁾ Szkoła Doktorska, Uniwersytet Medyczny w Lublinie

³⁾ Katedra Fizjologii Zwierząt, Wydział Medycyny Weterynaryjnej, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

⁴⁾ Klinika Toksykologii, Kliniczny Oddział Toksykologiczno-Kardiologiczny, Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. Stefana Kardynała Wyszyńskiego w Lublinie, Uniwersytet Medyczny w Lublinie,

⁵⁾ Akademia Bielska im. Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

⁶⁾ Wydział Wychowania Fizycznego i Zdrowia, Akademia Wychowania Fizycznego Józefa Piłsudskiego w Warszawie, Filia w Białej Podlaskiej

⁷⁾ Zakład Epidemiologii i Zdrowia Publicznego UM w Łodzi

STRESZCZENIE

Szerokie rozpowszechnienie mykotoksyn, w tym aflatoksyny B1 i ochratoksyny A, w środowisku oraz ich wpływ na organizmy żywe sprawiają, że stanowią one interesujący problem badawczy. Znane są liczne powikłania zatrucia tymi substancjami, jednak szczególną uwagę zwraca ich wpływ na układ kostny i nerwowy. Efekt zapalny, prezentowany przez wzrost stężenia cytokin - IL-6 i TNF- α może wpływać na dysregulację immunologiczną obecną w zaburzeniach metabolizmu kostnego, a także w neurodegeneracji. Mykotoksyny przyczyniają się również do osteodegeneracji poprzez modyfikację metabolizmu witaminy D. Interesujący i wciąż niezbadany jest mechanizm wpływu wewnątrzmacicznego na metabolizm kości i procesy neurodegeneracji. Zrozumienie powyższych mechanizmów może pomóc w monitorowaniu toksycznych skutków zatrucia tymi toksynami. Może również pomóc w opracowaniu metod terapii zatrucia tym związkami u zwierząt i ludzi

Słowa kluczowe: metabolizm kości; rozwój kości; przebudowa kości; mykotoksyna; aflatoksyna B1; ochratoksyna A; neurodegeneracja.

ARTICLE INFO

PolHypRes 2022 Vol. 80 Issue 3 pp. 61–72

ISSN: 1734-7009 eISSN: 2084-0535

DOI: 10.2478/phr-2022-0017

Strony: 13, rysunki: 0, tabele: 0

page www of the periodical: www.phr.net.pl

Typ artykułu: przeglądowy

Termin nadesłania: 25.02.2022 r.

Termin zatwierdzenia do druku: 09.03.2022 r.

Publisher

Polish Hyperbaric Medicine and Technology Society



WSTĘP

Mykotoksyny, w tym aflatoksyna B1 i ochratoksyna A, są związkami szeroko rozpowszechnionymi w naturalnym środowisku człowieka, co skutkuje wysokim prawdopodobieństwem zatrucia tymi substancjami, dlatego wielu naukowców podejmuje badania mające na celu zdefiniowanie mechanizmów toksycznego działania aflatoksyny B1 i ochratoksyny A oraz odkrycie metod ich neutralizacji. Efekt zapalny tych mykotoksyn może wpływać na dysregulację immunologiczną obecną w chorobach neurodegeneracyjnych i zaburzeniach metabolizmu kości, a także w wielu innych patologiach. Wykorzystanie IL-6 i TNF- α jako czynników prognostycznych jest obecnie przedmiotem licznych badań. Mykotoksyny to substancje o działaniu toksycznym, które powstają jako wtórny produkt metabolizmu grzybów pleśniowych powszechnie występujących w środowisku naturalnym [1]. Do tej grupy związków należą aflatoksyny i ochratoksyna A [2]. Aflatoksyny zostały odkryte w 1960 roku, kiedy to w Anglii ponad 100 000 indyków w padło z powodu zatrucia, jak się okazało trzy lata później, aflatoksynami, które znajdowały się w paszy z grysem z orzeszkami w ziemnych [3]. Pierwsze przypadki zatrucia ochratoksyną u drobiu zostały opisane w Stanach Zjednoczonych przez Hamiltona i współpracowników w latach 80. i dotyczyły indyków, kur niosek i kurcząt brojlerów [4-6]. Aflatoksyny to grupa związków o specyficznych właściwościach chemicznych, wytwarzanych przez rodzaj *Aspergillus*, w ramach których obficie występują dwa gatunki: *Aspergillus flavus* i *Aspergillus parasiticus* [7]. Są to saprotrofy, które szybko rozwijają się w tropikalnych i subtropikalnych warunkach klimatycznych, tj. w wysokiej temperaturze (optymalnie 27°C) i wysokiej wilgotności. Rozwijają się w glebie oraz w uszkodzonych lub rozkładających się roślinach [7-10]. Zarodniki są przenoszone przez owady (np. szkodniki upraw), takie jak omacnica prosowianka (*Ostrinia nubilalis*), ale także przez prądy wiatru [7,11]. Ochratoksyna A jest wytwarzana przez jedną z gatunków z rodzaju *Aspergillus* i dziesięć gatunków grzyba *Penicillium*. Głównymi gatunkami grzybów wytwarzających ochratoksynę A są *P. verrucosum*, *A. ochraceus* i *A. carbonarium* [12].

Wzrost tych grzybów nie jest równoznaczny z produkcją dużej ilości ochratoksyny, która zależy od szeregu czynników wewnętrznych, takich jak aktywność wody, pH i potencjał redoks, a także czynników zewnętrznych, takich jak wilgotność względna, temperatura, dostępność tlenu oraz jakość i skład podłoża [13]. Udowodniono, że produkcja ochratoksyny A jest większa w miejscach oświetlonych niż ciemnych, a także w obecności jonów żelaza, miedzi i cynku oraz przy pH=5,5. Im wyższe pH, tym wolniejsza synteza ochratoksyny [14]. Najczęściej zanieczyszczone są ziarna zbóż, co wynika z niewłaściwych warunków przechowywania i transportu, np. handel produktami spożywczymi między krajami sprzyja rozprzestrzenianiu się tych grzybów [8,15-17]. Innymi źródłami są orzechy, suszone owoce, oleje roślinne, rośliny lecznicze przechowywane w postaci suszonych ziół, przyprawy ziołowe, kukurydza, ryż, a także mięso i produkty mleczne zwierząt spożywających pasze zanieczyszczone tymi związkami [9,15,18-21].

Zwierzęta poprzez paszę lub środowisko, w którym żyją, mogą być narażone na mykotoksyny, które mogą gromadzić się i przedostawać do tkanek przeznaczonych do spożycia przez konsumenta, takich jak mleko lub mięso. Przejście to jest określane jako przeniesienie [22]. Najczęstszą i najbardziej toksyczną jest aflatoksyna B1. Swoją toksyczność zawdzięcza obecności pierścienia laktonowego i dwóch pierścieni furanowych (jeden z nich znajduje się na skrajnym końcu i posiada podwójne wiązanie, co decyduje o tak znacznej toksyczności i odpowiada za możliwość ścisłego wiązania się z cząsteczką białka lub DNA, a także za zakłócanie pracy komórki) [23]. Metabolizm aflatoksyny B1 zachodzi w wątrobie przy udziale cytochromu P450, w przebiegu licznych reakcji, takich jak hydroksylacja, demetylacja, epoksydacja, substancje wydalone z moczem i żółcią z organizmu, ale także addukty (takie jak wiązanie kowalencyjne egzoepoksydu AFB1-8,9-) z azotem N-7 guaniny), które gromadzą się we frakcji mikrosomalnej poprzez wiązanie z kwasami nukleinowymi i białkami wątroby. Związki te są mutagenne i przyczyniają się do rozwoju nowotworów [24-27]. Międzynarodowa Agencja Badań nad Rakiem (IARC) sklasyfikowała aflatoksynę B1 (AFB1) w grupie 1 jako "rakotwórczą dla ludzi" w 1993 roku [28]. Mają one działanie immunotoksyczne [29].

Nie ma bezpiecznego stężenia mykotoksyn w spożywanej żywności [30]. Mykotoksyny, zarówno aflatoksyny, jak i ochratoksyna A, są niebezpieczne dla ludzi, dlatego ich wpływ na organizmy zwierzęce jest tak interesujący. Zatrucie pokarmowe aflatoksynami może mieć charakter ostry lub przewlekły, w zależności od dawki i czasu ekspozycji. Ostre zatrucie charakteryzuje się obrzękiem płuc, bólem brzucha, nudnościami, wymiotami, żółtaczką, gorączką, krwotokiem z narządów wewnętrznych, drgawkami, a nawet śpiączką. Zatrucie przewlekłe charakteryzuje się uszkodzeniem wątroby, nerek i ośrodkowego układu nerwowego. Mogą wystąpić objawy marskości wątroby, obrzęki kończyn dolnych, alergie skórne i oddechowe, zaburzenia wzrostu i rozwoju, zaburzenia psychiczne, zwiększona podatność na infekcje, brak apetytu, złe samopoczucie itp. Aflatoksyna jest ważna w rozprzestrzenianiu się zakażenia HIV poprzez jej immunotoksyczne działanie na odpowiedź immunologiczną, w której pośredniczą komórki CD4⁺. (CD - klastery różnicowania) [31-35]. Ochratoksyna A jest również związana z indukcją wielu negatywnych skutków w organizmie zwierząt i ludzi. Powoduje niebezpieczną chorobę zwaną bałkańską endemiczną nefropatią (BEN) [36-41].

Ochratoksyna A jest trzykrotnie bardziej toksyczna dla drobiu niż aflatoksyna, dlatego zatrucie ochratoksyną jest najczęściej obserwowane w tej grupie zwierząt [42]. Zatrucie obserwowano u brojlerów otrzymujących pojedynczą paszę zawierającą 16 mg/kg ochratoksyny A, wykazywały one objawy ostrej ochratoksykozy objawiającej się apatią, biegunką, zaburzeniami koordynacji ruchowej, wyczerpaniem i śmiercią kurcząt w ciągu 22-25 godzin od podania toksyny [43]. Przewlekłe zatrucie OTA wiąże się ze zmniejszeniem spożyciem paszy, zwiększonym pragnieniem i zmianami w nerkach [44,45]. Z kolei przewlekłe zatrucie ochratoksyną A u drobiu charakteryzuje się zaburzeniami: wzrostu, krzepnięcia krwi, fagocytozy, integralności tkanki kostnej i nabłonka jelitowego [46-50]. W krajach Unii Europejskiej ustalono maksymalne dopuszczalne dawki ochratoksyny A, aby zapobiec zatruciu pokarmem dla ludzi, które wynoszą na przykład 5 μg / kg w zbożach (ryż, jęczmień) lub 3 μg / kg dla produktów zbożowych i ziaren zbóż przeznaczonych bezpośrednio do spożycia przez ludzi [51]. Ochratoksyna A została uznana za czynnik rakotwórczy przez Międzynarodową Agencję Badań nad Rakiem (IARC) i została sklasyfikowana jako rakotwórcza grupa 2B [51,52].

Aflatoksyna B1 znana jest głównie jako hepatotoksyna, a ochratoksyna A jako nefrotoksyna, jednak niezwykle interesujący jest destrukcyjny wpływ ochratoksyny A i aflatoksyny B na tkankę kostną i procesy neurodegeneracyjne.

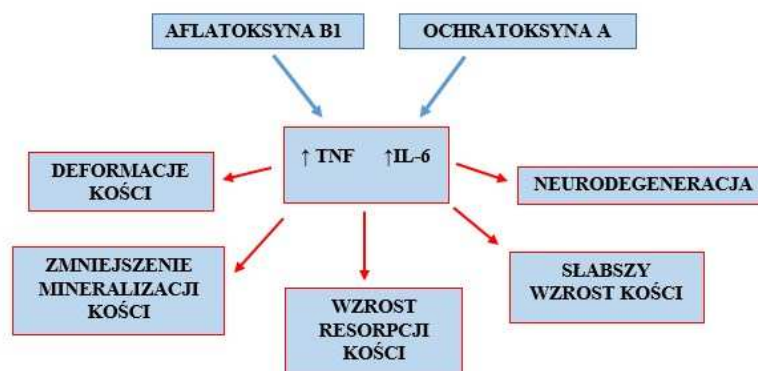
Mykotoksyny, w tym aflatoksyna B1 i ochratoksyna A, są związkami szeroko rozpowszechnionymi w naturalnym środowisku człowieka, o czym wspomniano powyżej, co skutkuje wysokim prawdopodobieństwem zatrucia tą substancją, dlatego też wielu naukowców podejmuje badania mające na celu określenie mechanizmów ich toksycznego działania oraz odkrycie sposobów ich neutralizacji. Nieprawidłowości w stężeniach cytokin i zaburzenia w układach enzymatycznych wywołane przez te mykotoksyny mogą prowadzić do dysfunkcji komórek. Prozapalne działanie tych substancji może przyczyniać się do utraty masy kostnej, a także dysregulacji immunologicznej występującej w chorobach neurodegeneracyjnych. Wykorzystanie IL-6 i TNF- α jako czynników prognostycznych jest obecnie przedmiotem licznych badań.

Interleukina 6 (IL-6) i TNF- α to cytokiny prozapalne o wielokierunkowym działaniu (ryc. 1). Pierwsza z nich jest produkowana przez monocyty i makrofagi. Bierze udział w odpowiedzi immunologicznej, hematopoezie i kancerogenezie. Ułatwia wzrost guza poprzez hamowanie apoptozy komórek nowotworowych i indukowanie angiogenezy w jego obrębie. Stymuluje procesy zapalne poprzez pobudzanie różnicowania limfocytów B w komórki plazmatyczne, wraz z IL-1 aktywuje limfocyty T, indukuje produkcję białek ostrej fazy, a jednocześnie hamuje produkcję TNF- α [53-55]. Drugi z nich, TNF- α , produkowany jest głównie przez monocyty i makrofagi. Stymuluje produkcję białek ostrej fazy, fagocytozę, powstawanie i różnicowanie limfocytów B, T i NK. Indukuje wzrost stężenia wolnych rodników wewnątrz komórek nowotworowych, prowadząc w ten sposób do apoptozy [56,57].

WPLYW MYKOTOKSYN NA METABOLIZM KOŚCI

W wielu badaniach udowodniono toksyczny wpływ na tkankę kostną i nerwową, czego przykładem jest badanie przedstawione przez Rouibah w pracy doktorskiej [52]. Autor zauważył, że pomiary średnicy kości piszczelowej i stopnia jej porowatości wyraźnie dowiodły zahamowania syntezy tkanki kostnej po 10 dniach podawania ochratoksyny. W kolejnych dniach synteza kości została wznowiona wraz ze wzrostem masy kostnej, nastąpił widoczny wzrost gęstości mineralnej kości (BMD), objawiający się niższym stopniem porowatości. Dlatego też, pomimo wznowienia syntezy tkanki kostnej, nie była ona w stanie utrzymać ciężaru ptaka, a w konsekwencji kości uległy deformacji. Huff i wsp. [58] sprawdzili wpływ stopniowanych poziomów zarówno aflatoksyny, jak i ochratoksyny na tkankę kostną, wykorzystując młode kurczęta jako model zwierzęcy. Podczas badania określono wytrzymałość na złamanie, przemieszczenie przed uszkodzeniem i średnicę ich kości piszczelowych. Szkodliwy wpływ mykotoksyn na tkankę kostną przejawiał się zmniejszeniem odporności mechanicznej kości i zwiększeniem jej elastyczności. Co więcej, mechaniczne osłabienie kości było związane z niższą dawką aflatoksyny (2,5 $\mu\text{g/g}$) i ochratoksyny (2 $\mu\text{g/g}$), podczas gdy wyższe dawki (odpowiednio 5,0 i 4,0 $\mu\text{g/g}$) wpływały na wzrost kości poprzez zmniejszenie średnicy centralnej kości [58].

O pogorszeniu właściwości mechanicznych kości piszczelowej po zatruciu ochratoksyną A donosili Duff i wsp. [49]. Autorzy zaobserwowali uogólnioną osteopenię szkieletu z zaburzeniami endochondrialnego i śródbłonkowego tworzenia tkanki kostnej. Podsumowując, autorzy postulowali, że ochratoksyna bezpośrednio wpływa na metabolizm osteoblastów i w konsekwencji powoduje rozwój osteoporozy [49]. Co ciekawe, opinia ta jest pierwszą, która wskazuje na bezpośredni wpływ mykotoksyn na zaburzenia metaboliczne układu kostnego.



Rys. 1 Działanie biologiczne aflatoksyny B1 i ochratoksyny A.

Pomimo istnienia bezpośredniego związku między mykotoksynami a metabolizmem tkanki kostnej, istotny jest również pośredni wpływ tych toksyn na kości. Związek IL-6 i TNF- α z metabolizmem kości i osteoimmunologią jest niezwykle interesujący, o czym świadczy jedna z publikacji z 2020 roku przeprowadzająca metaanalizę badającą powyższy temat [59]. TNF- α i IL-6 regulują odporność poprzez różne mechanizmy. TNF- α hamuje aktywność osteoblastów na niektórych etapach różnicowania, a ponadto stymuluje proliferację i różnicowanie osteoklastów (ryc. 1). IL-6 działa w sposób złożony, wpływając na osteoblasty i osteoklasty, powodując podwójne efekty. Może hamować działanie, ale także stymulować działanie osteoblastów. W badaniach *in vitro* zaobserwowano wzrost liczby receptorów IL-6 na powierzchni osteoblastów, zmniejszenie proliferacji i różnicowania preosteoblastów, a ostatecznie indukcję apoptozy dojrzałych komórek. Jednocześnie istnieją różne doniesienia na temat hamowania apoptozy osteoblastów przez IL-6 i intensyfikacji ich różnicowania poprzez gen p21. Co więcej, zarówno TNF- α , jak i IL-6 mogą pośredniczyć w aktywności osteocytów [59,60].

Zatrucie ochratoksyną A wiąże się ze wzrostem ekspresji IL-6 i TNF- α , podobnie jak ekspozycja na aflatoksynę B1, co sugeruje ich pośredni wpływ na procesy niszczące kości [29,61]. Weidenbach i wsp. [62] stwierdzili, że ochratoksyna A indukuje uwalnianie TNF- α z izolowanej i pozbawionej krwi perfundowanej wątroby szczura. Wang i wsp. [61] opisali wzrost poziomu IL-6 w analizie histologicznej tkanki wątroby po leczeniu OTA. Mehrz i wsp. [63] udokumentowali, że leczenie aflatoksyną B1 indukuje odpowiedź prozapalną w mysich komórkach pochodzących z OUN poprzez wzrost IL-6 i TNF- α . Wzrost poziomów TNF- α i IL-6 po ekspresji aflatoksyny B1 został również oceniony przez Meissonnier i wsp. [29] metodą PCR w czasie rzeczywistym w śledzienie świń.

WPLYW NA METABOLIZM WITAMINY D

Ponadto, istnieje jeszcze jeden pośredni mechanizm wpływu mykotoksyn na metabolizm kości i zależy on od metabolizmu witaminy D. Zależność tę opisali Sergeev i wsp. [64,65]. Autorzy opisali wpływ aflatoksyny B1 i T-2 na metabolizm Ca i układ hormonalny witaminy D u młodych szczurów. Podawanie mykotoksyn wiązało się z hipokalcemią i zmniejszonym wchłanianiem wapnia. Ponadto zaobserwowano obniżenie aktywności fosfatazy alkalicznej w błonie śluzowej jelita cienkiego oraz zaburzenia w przedziale kości beleczkowej, prowadzące do osteopetrozy. Autorzy zaobserwowali również obniżenie aktywności 25-hydroksylazy w wątrobie o 58% i obniżenie poziomu 25(OH)D3 w surowicy (28%) w wyniku zatrucia toksyną T2, podczas gdy aflatoksyna B1 powoduje obniżenie odpowiednio o 33% i 34%. Następnie aktywność 25(OH)D3-1-hydroksylazy w nerkach pozostała niezmienną, podczas gdy aktywność 24-hydroksylazy miała tendencję do zmniejszania się. Dodatkowo, ekspresja jądrowych receptorów 1,25(OH)2D3 w błonie śluzowej jelita cienkiego zmniejszyła się, podczas gdy receptory cytoplazmatyczne wzrosły 2,5-krotnie, co wskazuje na zmniejszenie internalizacji receptorów Sergeev et al. [64]. Aflatoksyna B1 może zakłócać różne szlaki molekularne indukowane witaminą D [66]. Podsumowując, zaburzenia metabolizmu wapnia spowodowane wpływem mykotoksyn mogą być związane z niedoborem witaminy D3 Sergeev et al. [65].

WADY KOŚCI ZWIĄZANE Z WEWNĄTRZMACIENNYM NARAŻENIEM NA MYKOTOKSYNY

Wpływ mykotoksyn na płód jest wielokierunkowy, a efekty osteotropowe często zależą od dawki obciążającej płód. Niemniej jednak, niezależnie od dawki, na jaką narażone są płody, działanie mykotoksyn determinuje zaburzenia w procesach kostnienia [67]. Zależność ta jest również wspólna dla różnych gatunków zwierząt. Dowodzą tego badania Abdulrazzaq i wsp. [68], El-Nahla i wsp. [69] oraz Fetaih i wsp. [70]. Autorzy ci, w badaniach na myszach, królikach i szczurach, stosując odpowiednio różne dawki, czasy ekspozycji i drogi podania, wykazali zaburzenia kostnienia szkieletu osiowego. Pomimo tej wspólnej zależności cytowanych badań, można również zauważyć różnice. Abdulrazzaq i wsp. [68] podając aflatoksynę B1 dootrzewnowo w pojedynczej dawce 20 mg/kg myszom w 7. lub 13. dniu życia płodowego, odnotowali również nieprawidłowości kostnienia kości nadgnykowej, kończyn miednicznych i piersiowych, a także paliczek śródreżca/śródstopia. Króliki stanowiące model zwierzęcy w badaniach El-Nahla i wsp. [69], którym podawano aflatoksynę B1 w dawce 0,05 mg/kg przez zgłębnik, charakteryzowały się wadami rozwojowymi zeber i mostków oraz krótszymi kośćmi kończyn miednicznych. Fetaih i wsp. [70] stosując u szczurów aflatoksynę B1 w dawce 1 mg/kg podawaną przez zgłębnik między 6. a 15. dniem życia odnotowali dodatkowo zaburzenia kostnienia kości klatki piersiowej i kończyn miednicznych. Wangikar i wsp. [71,72] stosowali ochratoksynę lub aflatoksynę b1 wyłącznie i w kombinacji u szczurów między 5 a 15 dniem ciąży. Autorzy wykazali nieprawidłowe kostnienie czaszki objawiające się jej zmniejszoną grubością, prowadzące do encefalopatii po podaniu ochratoksyny. Należy przypuszczać, że u podstaw tych zmian leży bezpośredni wpływ mykotoksyn na osteoblasty i osteoklasty, powodując zaburzenia mineralizacji osteoidów, co ma bezpośredni wpływ na tworzenie nowej kości okostnej [50].

WPLYW NA PROCESY NEURODEGENERACJI

W 2017 r. Mehrzad i wsp. [63] opisali prozapalny wpływ aflatoksyny B1 na komórki pochodzące z OUN. Wpływ aflatoksyny B1 na komórki i układ nerwowy jest słabo poznany, a do jego oceny wykorzystano mysie czyste pierwotne astrocyty, podkomorowe neuronalne komórki prekursorowe (NPC) i linie komórek mikrogleju (BV2). Komórki były narażone oddzielnie na odpowiedni poziom (20 ng/ml) AFB1 przez 1, 2, 3, 6, 12, 24 i 48 godzin w hodowli. W każdym punkcie czasowym badania oznaczano: całkowitą produkcję wolnych rodników, produkcję cytokin IL-1 β , IL-10 oraz interesujących nas IL-6, TNF- α , a także zestawu genów zaangażowanych w natychmiastową odpowiedź na zagrożenie, takich jak TLR2, TLR4 i iNOS, itp. Zaobserwowano znaczący wzrost liczby wolnych rodników w komórkach mikrogleju po 24 godzinach testu, ich niewielki wzrost w pozostałych badanych komórkach. Toksyna indukowała również wzrost cytokin prozapalnych, w komórkach mikrogleju dominował wzrost TNF- α , a w astrocytach IL-6. Zaobserwowano również wzrost ekspresji mRNA TLR2, TLR4, MyD88 i NF- κ B. Powyższe wyniki mogą sugerować wpływ odpowiedniej dawki AFB1 na zaburzenia immunologiczne obserwowane w chorobach neurodegeneracyjnych [63].

Kolejnym badaniem oceniającym wpływ mykotoksyny na proces neurodegeneracji, tym razem ochratoksyny A, jest badanie przeprowadzone przez Chansawhang i wsp [73]. Badacze oceniali wpływ tej toksyny na aktywację mikrogleju w ośrodkowym układzie nerwowym, a także badali wpływ kortykosteroidów na powyższy proces. Komórki mikrogleju mysiego (BV-2) stymulowano OTA, a następnie określano nasilenie stanu zapalnego wywołanego przez OTA poprzez wstępne leczenie kortykosteronem. Określono ekspresję mediatorów prozapalnych, w tym czynnika martwicy nowotworów α (TNF- α), interleukiny-1 β (IL-1 β), interleukiny-6 (IL-6) i indukowalnej syntazy tlenu azotu (iNOS). Fosforylację kinaz białkowych aktywowanych mitogenami (MAPK) analizowano metodą western blotting. Zaobserwowano znaczny wzrost ekspresji wszystkich powyższych markerów prozapalnych.

Przeprowadzono wstępne leczenie kortykosteronem, zwiększając odpowiedź neurozapalną na ochratoksynę poprzez mechanizm zależny od receptora mineralokortykoidowego (MR) związany ze wzrostem kinazy regulowanej

sygnałem zewnątrzkomórkowym (ERK) i p38 MAPK. Wyniki tego badania sugerują bezpośredni wpływ ochratoksyny A na aktywację mikrogleju i wskazują na wzmocnienie neurodegeneracji przez niskie poziomy kortykosteronu [73].

WNIOSKI

Szerokie rozpowszechnienie mykotoksyn w środowisku oraz ich wpływ na organizmy żywe sprawiają, że stanowią one interesujący problem badawczy. Znane są liczne powikłania zatrucia tymi substancjami, jednak szczególną uwagę zwraca się na ich wpływ na układ kostny i nerwowy. Okresowe hamowanie proliferacji komórek osteogennych przez mykotoksyny, zarówno aflatoksynę B₁, jak i ochratoksynę A, spadek mineralizacji kości oraz wpływ na mniejszą syntezę kolagenu prowadzą do gorszego wzrostu, mniejszej sztywności i deformacji kości. Jednym z mechanizmów działania tych mykotoksyn jest wzrost stężenia cytokin - IL-6 i TNF- α , które mają destrukcyjny wpływ na tkankę kostną. Mykotoksyny przyczyniają się również do osteodegeneracji poprzez modyfikację metabolizmu witaminy D. Interesujący i wciąż niezbadany jest mechanizm wewnątrzmacicznego wpływu na metabolizm kości i procesy neurodegeneracyjne. Zwiększając stężenie cytokin IL-6 i TNF- α , mykotoksyny te wpływają również na procesy neurodegeneracji. Zrozumienie powyższych mechanizmów może pomóc w monitorowaniu toksycznych skutków zatrucia tymi toksynami. Może być również pomocne w opracowaniu metod terapii zatrucia tym związkiem u zwierząt i ludzi.

Wkład autora: A.R.P. był twórcą artykułu i opracował wstępną strategię wyszukiwania. A.P.R., A.B., R.P.R., M.B., J.S. uczestniczyli w wyszukiwaniu, selekcji, analizie i ekstrakcji danych z artykułów. A.P.R. napisała manuskrypt. A.B., R.P.R., M.B. i J.S. omówili i zredagowali manuskrypt. Wszyscy autorzy krytycznie przejrżeli i zatwierdzili ostateczną wersję artykułu.

Finansowanie: Badania te nie otrzymały zewnętrznego finansowania.

Oświadczenie Institutional Review Board: Niniejsza praca nie obejmowała badań na ludziach ani zwierzętach wymagających przeglądu IRB.

Oświadczenie o świadomej zgodzie: Praca ta nie obejmowała podmiotów ludzkich ani świadomej zgody.

Oświadczenie o dostępności danych: Wszystkie dane wygenerowane lub przeanalizowane podczas tego badania są zawarte w tym artykule.

Konflikt interesów: Autorzy nie zgłaszają konfliktu interesów.

LITERATURA

- Jarzynka S, Dąbkowska M, Netsvyetayeva I, Swoboda-Kopeć E. Mycotoxins - dangerous metabolites of moulds. *Med Rodz.* 2010, 4, 113-9.
- Lesic T, Vulic A, Vahcic N, Sarkanj B, Hengl B, Kos I, et al. The Occurrence of Five Unregulated Mycotoxins Most Important for Traditional Dry-Cured Meat Products. *Toxins (Basel).* 2022, 14(7).
- Asao T, Buechi G, Abdel-Kader MM, Chang SB, Wick EL, Wogan GN. The Structures of Aflatoxins B and G. *J Am Chem Soc.* 1965, 87, 882-6.
- Biro K, Solti L, Barna-Vetro I, Bago G, Glavits R, Szabo E, et al. Tissue distribution of ochratoxin A as determined by HPLC and ELISA and histopathological effects in chickens. *Avian Pathol.* 2002, 31(2), 141-8.
- Kumar A, Jindal N, Shukla CL, Pal Y, Ledoux DR, Rottinghaus GE. Effect of ochratoxin A on *Escherichia coli*-challenged broiler chicks. *Avian Dis.* 2003, 47(2), 415-24.
- Marquardt RR, Frohlich AA. A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci.* 1992, 70(12), 3968-88.
- Richard JL, Bennett GA, Ross PF, Nelson PE. Analysis of naturally occurring mycotoxins in feedstuffs and food. *J Anim Sci.* 1993, 71(9), 2563-74.
- Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *Int J Food Microbiol.* 2007, 119(1-2), 3-10.
- Lai X, Zhang H, Liu R, Liu C. Potential for aflatoxin B₁ and B₂ production by *Aspergillus flavus* strains isolated from rice samples. *Saudi J Biol Sci.* 2015, 22(2), 176-80.
- Thompson C, Henke SE. Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species. *J Wildl Dis.* 2000, 36(1), 172-9.
- Dąbrowski Z, Beres P, Twardowski J, Hurej M, Klukowski Z, Warzecha R, et al. Possibilities and consequences of growing genetically modified maize cultivars resistant to pests. *Progress in Plant Protection.* 2013, 53, 837-43.
- Reboux G. Mycotoxines : effets sur la santé et interactions avec d'autres composants organiques. *Revue Française d'Allergologie et d'Immunologie Clinique.* 2006, 46(3), 208-12.
- Kostic AZ, Milincic DD, Petrovic TS, Krnjaja VS, Stanojevic SP, Barac MB, et al. Mycotoxins and Mycotoxin Producing Fungi in Pollen: Review. *Toxins (Basel).* 2019, 11(2).
- Roiubah K, Houszka M, Dzimira S. Pathogenic effects of ochratoxin A. *Med Weter.* 2013, 69(2), 91-5.
- Shabeer S, Asad S, Jamal A, Ali A. Aflatoxin Contamination, Its Impact and Management Strategies: An Updated Review. *Toxins (Basel).* 2022, 14(5).
- Barrett JR. Mycotoxins: of molds and maladies. *Environ Health Perspect.* 2000, 108(1), A20-3.
- Binder EM, Tan LM, Chin LJ, Handl J, Richard J. Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology.* 2007, 137(3-4), 265-82.
- European Food Safety Authority: Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to the potential increase of consumer health risk by a possible increase of the existing maximum levels for aflatoxins in almonds, hazelnuts and pistachios and derived products EFSA J. 2007, 446, 1-127.
- Nazhand A, Durazzo A, Lucarini M, Souto EB, Santini A. Characteristics, Occurrence, Detection and Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds. *Foods.* 2020, 9(5).
- Busman M, Bobell JR, Maragos CM. Determination of the aflatoxin M₁ (AFM₁) from milk by direct analysis in real time – mass spectrometry (DART-MS). *Food Control.* 2015, 47, 592-8.
- Pleadin J, Vulić A, Peršić N, Škrivanko M, Capek B, Cvetnić Ž. Annual and regional variations of aflatoxin B₁ levels seen in grains and feed coming from Croatian dairy farms over a 5-year period. *Food Control.* 2015, 47, 221-5.
- Tolosa J, Rodriguez-Carrasco Y, Ruiz MJ, Vila-Donat P. Multi-mycotoxin occurrence in feed, metabolism and carry-over to animal-derived food products: A review. *Food Chem Toxicol.* 2021, 158, 112661.
- Lee LS, Dunn JJ, DeLuca AJ, Ciegler A. Role of lactone ring of aflatoxin B₁ in toxicity and mutagenicity. *Experientia.* 1981, 37(1), 16-7.
- Bailey EA, Iyer RS, Stone MP, Harris TM, Essigmann JM. Mutational properties of the primary aflatoxin B₁-DNA adduct. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996, 93(4), 1535-9.
- Wild CP, Turner PC. The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions. *Mutagenesis.* 2002, 17(6), 471-81.
- Vondracek M, Xi Z, Larsson P, Baker V, Mace K, Pfeifer A, et al. Cytochrome P450 expression and related metabolism in human buccal mucosa. *Carcinogenesis.* 2001, 22(3), 481-8.



27. Gallagher EP, Wienkers LC, Stapleton PL, Kunze KL, Eaton DL. Role of human microsomal and human complementary DNA-expressed cytochromes P450A2 and P450A4 in the bioactivation of aflatoxin B1. *Cancer Res.* 1994, 54(1), 101-8.
28. World Health Organization (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC): Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Lyon, France 56, 1993 <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol56/mono56.pdf> (10.09.2015).
29. Meissonnier GM, Pinton P, Cossalter AM, Gong YY, Wild CP, et al. Immunotoxicity of aflatoxin B1: impairment of the cell-mediated response to vaccine antigen and modulation of cytokine expression. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2008, 231(2), 142-9.
30. Abia WA, Warth B, Suluyok M, Krska R, Tchana A, Njobeh PB, et al. Bio-monitoring of mycotoxin exposure in Cameroon using a urinary multi-biomarker approach. *Food Chem Toxicol.* 2013, 62, 927-34.
31. Louria DB, Finkel G, Smith JK, Buse M. Aflatoxin-induced tumors in mice. *Sabouraudia.* 1974, 12(3), 371-5.
32. Ekwomadu T, Mwanza M, Musekiwa A. Mycotoxin-Linked Mutations and Cancer Risk: A Global Health Issue. *Int J Environ Res Public Health.* 2022, 19(13).
33. Tong WM, Lee MK, Galendo D, Wang ZQ, Sabapathy K. Aflatoxin-B exposure does not lead to p53 mutations but results in enhanced liver cancer of Hupki (human p53 knock-in) mice. *Int J Cancer.* 2006, 119(4), 745-9.
34. Jolly PE. Aflatoxin: does it contribute to an increase in HIV viral load? *Future Microbiol.* 2014, 9(2), 121-4.
35. Semik-Orzech A, Barczyk A, Pierzchala W. The influence of sensitivity to fungal allergens on the development and course of allergic diseases of the respiratory tract. *Pneumonol Alergol Pol.* 2008, 76(1), 29-36.
36. Arsenovic A, Bukvic D, Trbojevic S, Maric I, Djukanovic L. Detection of renal dysfunctions in family members of patients with Balkan endemic nephropathy. *Am J Nephrol.* 2005, 25(1), 50-4.
37. Baudrimont I, Betbeder AM, Creppy EE. Reduction of the ochratoxin A-induced cytotoxicity in Vero cells by aspartame. *Arch Toxicol.* 1997, 71(5), 290-8.
38. Belmadani A, Tramu G, Betbeder AM, Steyn PS, Creppy EE. Regional selectivity to ochratoxin A, distribution and cytotoxicity in rat brain. *Arch Toxicol.* 1998, 72(10), 656-62.
39. Creppy EE, Kane A, Giessen-Crouse E, Roth A, Rosenthaler R, Dirheimer G. Effect of Ochratoxin A on enzyme activities and macromolecules synthesis in MDCK cells. *Arch Toxicol Suppl.* 1986, 9, 310-4.
40. Luhe A, Hildebrand H, Bach U, Dingermann T, Ahr HJ. A new approach to studying ochratoxin A (OTA)-induced nephrotoxicity: expression profiling in vivo and in vitro employing cDNA microarrays. *Toxicol Sci.* 2003, 73(2), 315-28.
41. Stefanovic V, Toncheva D, Atanasova S, Polenakovic M. Etiology of Balkan endemic nephropathy and associated urothelial cancer. *Am J Nephrol.* 2006, 26(1), 1-11.
42. Huff WE, Doerr JA. Synergism between aflatoxin and ochratoxin A in broiler chickens. *Poult Sci.* 1981, 60(3), 550-5.
43. Huff WE, Wyatt RD, Tucker TL, Hamilton PB. Ochratoxicosis in the broiler chicken. *Poult Sci.* 1974, 53(4), 1585-91.
44. Szczech GM, Carlton WW, Tuite J. Ochratoxicosis in Beagle dogs. I. Clinical and clinicopathological features. *Vet Pathol.* 1973, 10(2), 135-231.
45. Semon B. Dietary intake of cottonseed toxins is hypothesized to be a partial cause of Alzheimer's disorder. *Med Hypotheses.* 2012, 78(2), 293-8.
46. Kubena LF, Harvey RB, Huff WE, Corrier DE, Phillips TD, Rottinghaus GE. Influence of ochratoxin A and T-2 toxin singly and in combination on broiler chickens. *Poult Sci.* 1989, 68(7), 867-72.
47. Wang GH, Xue CY, Chen F, Ma YL, Zhang XB, Bi YZ, et al. Effects of combinations of ochratoxin A and T-2 toxin on immune function of yellow-feathered broiler chickens. *Poult Sci.* 2009, 88(3), 504-10.
48. Bouhet S, Oswald IP. The effects of mycotoxins, fungal food contaminants, on the intestinal epithelial cell-derived innate immune response. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005, 108(1-2), 199-209.
49. Duff SR, Burns RB, Dwivedi P. Skeletal changes in broiler chicks and turkey poults fed diets containing ochratoxin A. *Res Vet Sci.* 1987, 43(3), 301-7.
50. Dwivedi P, Burns RB. Effect of ochratoxin A on immunoglobulins in broiler chicks. *Res Vet Sci.* 1984, 36(1), 117-21.
51. Abarca ML, Accensi F, Bragulat MR, Castella G, Cabanes FJ. Aspergillus carbonarius as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. *J Food Prot.* 2003, 66(3), 504-6.
52. Rouibah K. Morphological and functional exponent at ochratoxin A toxicosis in the chickens: University of Life Sciences in Wroclaw; 2010.
53. Yard EE, Daniel JH, Lewis LS, Rybak ME, Paliakov EM, Kim AA, et al. Human aflatoxin exposure in Kenya, 2007: a cross-sectional study. *Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.* 2013, 30(7), 1322-31.
54. Culig Z, Steiner H, Bartsch G, Hobisch A. Interleukin-6 regulation of prostate cancer cell growth. *J Cell Biochem.* 2005, 95(3), 497-505.
55. Salgado R, Junius S, Benoy I, Van Dam P, Vermeulen P, Van Marck E, et al. Circulating interleukin-6 predicts survival in patients with metastatic breast cancer. *Int J Cancer.* 2003, 103(5), 642-6.
56. Gulcubuk A, Altunatmaz K, Sonmez K, Haktanir-Yatkin D, Uzun H, Gurel A, et al. Effects of curcumin on tumour necrosis factor-alpha and interleukin-6 in the late phase of experimental acute pancreatitis. *J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med.* 2006, 53(1), 49-54.
57. Voltan R, Secchiero P, Casciano F, Milani D, Zauli G, Tisato V. Redox signaling and oxidative stress: Cross talk with TNF-related apoptosis inducing ligand activity. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016, 81(Pt B), 364-74.
58. Huff WE, Doerr JA, Hamilton PB, Hamann DD, Peterson RE, Ciegler A. Evaluation of bone strength during aflatoxicosis and ochratoxicosis. *Appl Environ Microbiol.* 1980, 40(1), 102-7.
59. Wang T, He C. TNF-alpha and IL-6: The Link between Immune and Bone System. *Curr Drug Targets.* 2020, 21(3), 213-27.
60. Bienko M, Lis A, Wolski D, Radzki RP. Relationships between bone tissue and fat tissue. *Med Weter.* 2016, 72(4), 217-24.
61. Wang W, Zhai S, Xia Y, Wang H, Ruan D, Zhou T, et al. Ochratoxin A induces liver inflammation: involvement of intestinal microbiota. *Microbiome.* 2019, 7(1), 151.
62. Weidenbach A, Schuh K, Failing K, Petzinger E. Ochratoxin A induced TNFalpha release from the isolated and blood- free perfused rat liver. *Mycotoxin Res.* 2000, 16 Suppl 2, 189-93.
63. Mehrzad J, Malvandi AM, Alipour M, Hosseinkhani S. Environmentally relevant level of aflatoxin B1 elicits toxic pro-inflammatory response in murine CNS-derived cells. *Toxicol Lett.* 2017, 279, 96-106.
64. Sergeev IN, Arkhapchev Iu P, Kravchenko LV, Kodentsova VM, Piliia NM. [Effect of mycotoxins aflatoxin B1 and T-2 toxin on the vitamin D3 metabolism and binding of its hormonal form 1,25-dihydroxyvitamin D3 in rats]. *Vopr Med Khim.* 1988, 34(4), 51-7.
65. Sergeev IN, Piliia NM, Kuz'mina EE, Avren'eva LI, Kravchenko LV, Spirichev VB, et al. [Calcium and vitamin D metabolism and enzymes of xenobiotic metabolism during chronic action of mycotoxins]. *Vopr Pitan.* 1990, (5), 25-30.
66. 6Persico, M.; Sessa, R.; Cesaro, E.; Dini, I.; Costanzo, P.; Ritiene, A.; Fattorusso, C.; Grosso, M., A multidisciplinary approach disclosing unexplored Aflatoxin B1 roles in severe impairment of vitamin D mechanisms of action. *Cell Biol Toxicol.* 2022, 10.1007/s10565-022-09752-y.
67. da Silva JVB, de Oliveira CAF, Ramalho LNZ. Effects of Prenatal Exposure to Aflatoxin B1: A Review. *Molecules.* 2021, 26(23).
68. Abdulrazzaq YM, Padmanabhan R, Bastaki S, Kochyil J, Shafullah M. Teratogenic Effects of Aflatoxin B1 in Mice Exposed in Early and Late Gestation. *Pediatric Research.* 2011, 70(5), 405-.
69. El-Nahla SM, Imam HM, Moussa EA, Ibrahim AM, Ghanam AR. Teratogenic effects of aflatoxin in Rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). *Journal of Veterinary Anatomy.* 2013, 6(2), 67-85.
70. Fetaih HA, Dessouki AA, Hassanin AA, Tahan AS. Toxopathological and cytogenetic effects of aflatoxin B1 (AFB1) on pregnant rats. *Pathol Res Pract.* 2014, 210(12), 1079-89.
71. Wangikar PB, Dwivedi P, Sharma AK, Sinha N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. II. Histopathological features of teratological anomalies induced in fetuses. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2004, 71(6), 352-8.
72. Wangikar PB, Dwivedi P, Sinha N. Effect in rats of simultaneous prenatal exposure to ochratoxin A and aflatoxin B1. I. Maternal toxicity and fetal malformations. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 2004, 71(6), 343-51.
73. Chansawhang A, Phochantachinda S, Temviriyankul P, Chantong B. Corticosterone potentiates ochratoxin A-induced microglial activation. *Biomol Concepts.* 2022, 13(1), 230-41.

Radosław Piotr Radzki
Szkoła Doktorska, Uniwersytet Medyczny w Lublinie
radoslaw.radzki@up.lublin.pl