

УДК: 619:615.918:633.16:582.28.123.4

## ВИВЧЕННЯ ТРАНСЕПІТЕЛІАЛЬНОГО ЕЛЕКТРИЧНОГО ОПОРУ КУЛЬТУРИ КЛІТИН КИШКОВИКУ СВИНІ В ПРИСУТНОСТІ ТРИХОТЕЦЕНОВИХ МІКОТОКСИНІВ

Цибульський Д.В.

Сумський національний аграрний університет

**Резюме.** У статті наведена інформація щодо новітнього діагностичного тесту по виявленню ступеня токсичності мікотоксинів.

**Ключові слова:** мікотоксикози, деоксиніваленол, трансепітеліальний електричний опір, ентероцит, бар'єрна функція.

**Summary.** The information about a new diagnostical method for determination of the mycotoxins toxicity level is presented in the article.

**Key words:** mycotoxicosis, deoxynivalenol, transepithelial electrical resistance, enterocyte, barrier function.

**Вступ.** Мікотоксикози – захворювання, що розвиваються у тварин та птиці внаслідок поїдання кормів, контамінованих мікотоксинами, які є продуктами біосинтезу токсигенних мікроміцетів із родів *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* й ін. Більшість мікотоксинів володіють високою токсичністю, а деякі зумовлюють канцерогенний, тератогенний, мутагенний, ембріотоксичний, дисбактеріозний, імунодепресивний, алергенний, дерматонекротичний ефект [1].

Спричинене мікотоксинами отруєння тварин та птиці завдає господарствам значних економічних збитків через втрати кормів, зниження їх кормової цінності, підвищення чутливості тварин до мікозних, бактеріальних і вірусних захворювань, загибель тварин, витрати на проведення лікувальних та профілактичних заходів [2]. Одними з найнебезпечніших є трихотеценові мікотоксини, що продукуються в основному грибами роду *Fusarium*. Серед них основними є Т-2 токсин, ніваленол, деоксиніваленол та ін.[3].

Токсична дія трихотеценів проявляється головним чином у формі запалення слизових травного тракту, іноді до некротичного. Вони вражають також нервову й серцево-судинну системи, печінку, пригнічують імунітет. Умовами для утворення даних токсинів є підвищена вологість й низька температура. Як правило, в одному продукті знаходять зразу декілька трихотеценів [4, 5].

Кишковик є головним місцем наявності забруднюючих речовин та токсинів, що знаходяться у кормі та воді, і являє собою перший бар'єр під час проковтування контамінованого корму з можливими високими концентраціями мікотоксинів.

Кишковик має бар'єрну функцію, що забезпечується епітеліальними кишковими клітинами, які забезпечують, з одного боку, фізичний бар'єр, а з іншого - приймають участь у здійсненні місцевої імунної реакції

(Eckmann et al. , 1995 ; Pitman et Blumberg, 2000). Їхня участь у вродженому й набутому імунитеті відбувається за допомогою різних механізмів, таких як продукція мукусу (слизу), антибактеріальних пептидів, продукція Ig A, запальних цитокінів (Oswald, 2006). Численні фактори, такі як гормони, протеази, цитокіни, нейротрансмітери, а також ксенобіотики, можуть порушувати структуру й функцію кишечного епітеліального бар'єру.

Кишковик, який є першим бар'єром під час проковтування контамінованого корму, може вражатися дією високих концентрацій мікотоксинів, які в свою чергу можуть порушувати здатність ентероцитів підтримувати бар'єрну функцію (Lewis et al., 1995).

Лінія клітин IPES – 1, що використовувалась у досліді, була отримана з кишечного епітелію голодної та клубової кишки новонародженого поросяти. Фібробласти були видалені послідовними етапами трипсинізації й вибіркової пересадки. Ця лінія клітин може культивуватися до 100 пасажів, не змінюючи при цьому характеристик росту й транспортування (Pinton, 2007).

**Метою нашої роботи було** вивчення трансепітеліального електричного опору (TEER –Transsepithelial Electrical Resistance) культури клітин кишкового свині.

**Матеріали та методи .** Досліди виконувались на базі фармакологічно-токсикологічної лабораторії Національного інституту сільськогосподарських досліджень (INRA) м. Тулуза, Франція.

В досліді проводилось вимірювання трансепітеліального електричного опору (ТЕЕО) культури клітин кишкового свині (IPES-1), яка вирощувалася в присутності трихотеценових мікотоксинів (деоксиніваленол, ніваленол, 15-О-Ацетил-4-деоксиніваленол та 3-Ацетилдеоксиніваленол) на протязі 11 діб.

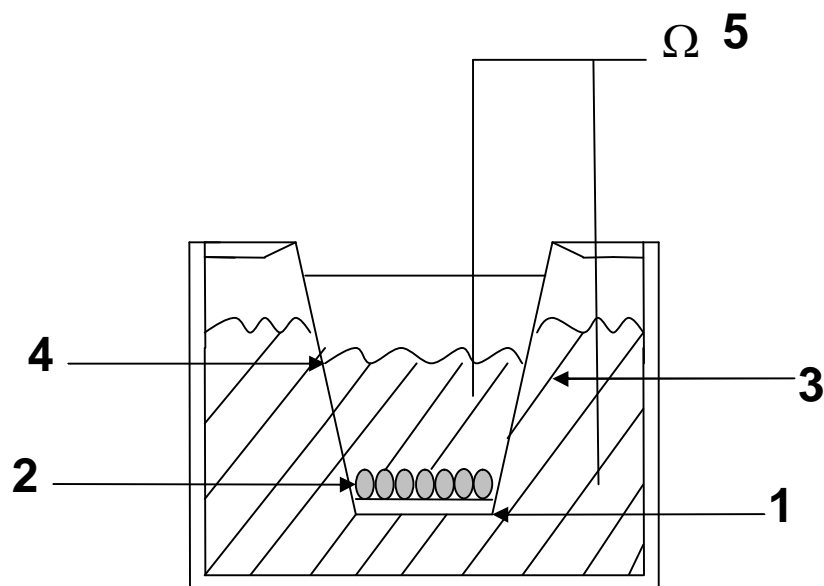
ТЕЕО є корисним параметром для кількісного вираження бар'єрної функції в ендотеліальних й епітеліальних клітинах. На протязі останніх двох десятиріч метод виміру ТЕЕО став універсальним, зручним, надійним та неруйнівним методом, який добре зарекомендував себе щодо визначення й контролю росту культур клітин *in vitro* [14, 9, 7].

Для вимірювання використовували фільтри для культури клітин (cell culture inserts), по 1 для кожного зразку (контроль, ДОН, ніваленол, 15-АДОН та 3-АДОН). В кожен з них додавали 0,5 мл. клітин в концентрації 100000  $\phi$  / фільтр. Зовні також додавали середовище – 1 мл (рис.1). Через 2-3 доби, коли клітини розмножились у фільтрі, замінюємо середовище для проліферації на середовище, яке сприяє диференціації клітин. В подальшому диференційне середовище замінюємо кожні 2 доби й додаємо новий розчин мікотоксинів. Вимірювання ТЕЕО здійснювали кожен день в один і той же час за допомогою вольтометра EVOM (X). Фінальна концентрація для кожного токсину у розчині становить 5 $\mu$ M. Протягом досліді зразки залишали в термостаті при t 39 °C в присутності CO<sub>2</sub> на рівні 5%.

Протягом всього етапу досліджень використовували токсин деоксиніваленол, ніваленол, 15-О-Ацетил-4-деоксиніваленол та 3-Ацетилдеоксиніваленол (виробник Sigma, USA), культуру клітин кишечника

свині ІРЕС, фільтри для культури клітин (Falcon). Для проліферації клітин використовували поживне середовище, яке складається із: середовища DMEM HAM F-12 – Sigma, USA, сироватки телячого ембріону, L- глютаміну (200мМ) виробник – Eurobio (Франція), водний розчин антибіотиків (пеніциліну й стрептоміцину) по 10 000 ul/ml, рідини ITS ( інсулін-(5μg/ml), трансферин (5μg/ml) й селен (5ng/ml)) та EGF (епідермальний фактор росту)- 100μg/ml. Для диференціації – такий самий склад, але замість сироватки телячого ембріону додавали дексаметазон (20 μg/ml) [11, 13].

**Рис.1** - Схема розташування фільтру



**Позначення:**

- 1.Мембрана;
- 2.Клітини;
- 3.Поживне середовище;
- 4.Фільтр;
- 5.Розташування електродів вольтометра.

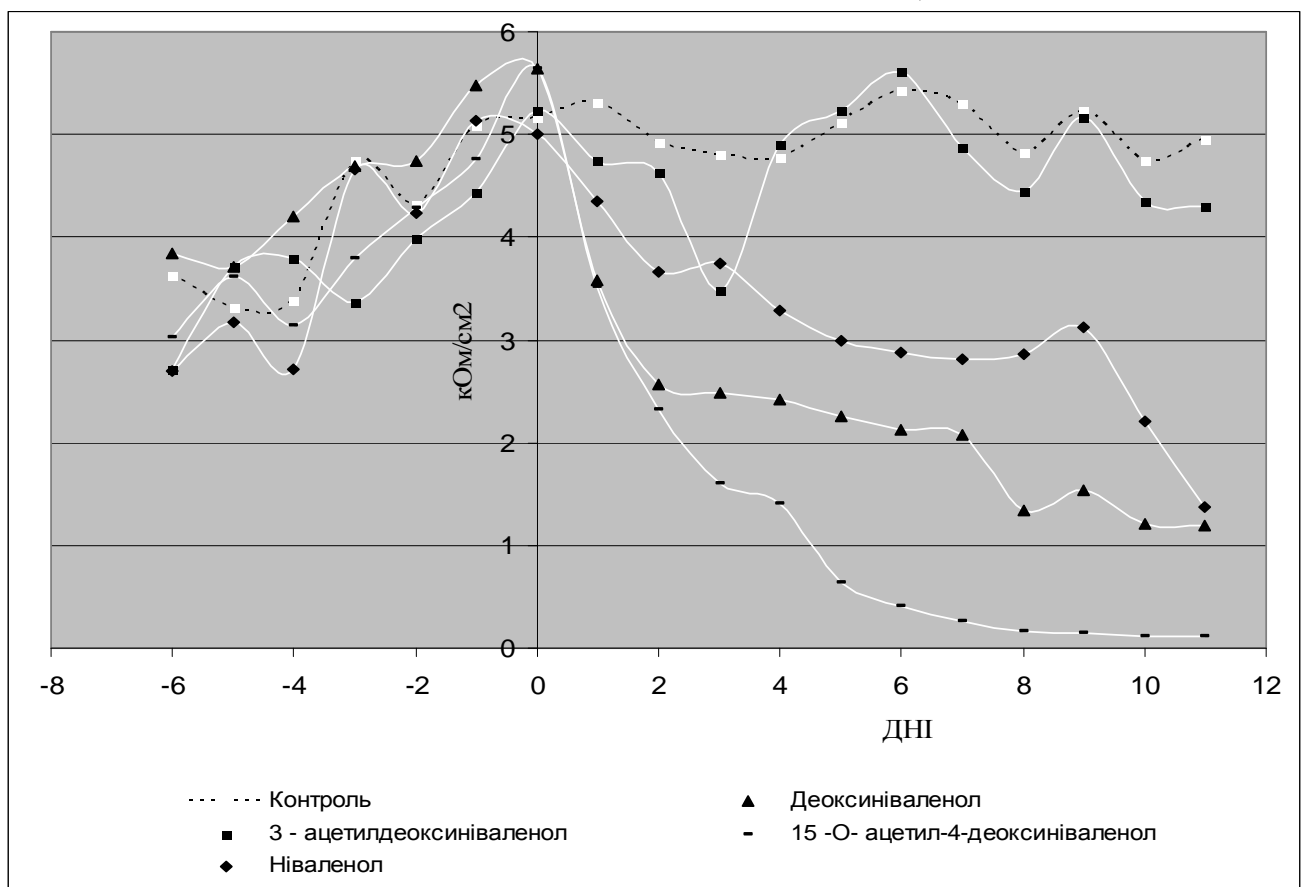
**Результати досліджень і обговорення.** При вимірюванні електричного опору культури клітин кишкового свині (ІРЕС), яка вирощувалася в присутності деоксиніваленолу, ніваленолу, 15-О-Ацетил-4-деоксиніваленолу та 3-Ацетилдеоксиніваленолу, відмічено, що в присутності кожного з зазначених токсинів спостерігається різне пригнічення росту клітин.

Істотне зниження показників відбувається в перші 2-4 дні. Потім спостерігається незначне підвищення і стабілізація показників в межах норми (контроль, 3-Ацетилдеоксиніваленон) або подальше їх зниження (деоксиніваленон, ніваленон, 15-О-Ацетил-4-деоксиніваленон). Максимальне пригнічення росту клітин, згідно показників ТЕЕО, відбувається приблизно на 8-10-ий день (рис.2).

Таким чином, встановлено, що:

- ріст показників ТЕЕО культури клітин ІРЕС в присутності деоксініваленолу, ніваленолу, 15-О-Ацетил-4-деоксініваленолу та 3-Ацетилдеоксініваленолу уповільнюється по різному для кожного з токсинів;
- найбільш токсичним серед представлених є 15-О-Ацетил-4-деоксініваленол;
- найменшу токсичність щодо культури клітин ІРЕС має 3-Ацетилдеоксініваленол.

**Рис. 2** - Визначення трансепітеліального електричного опору (TEER –Trans epithelial Electrical Resistance) культури клітин ІРЕС-1 в присутності трихотеценових мікотоксинів (деоксініваленол, ніваленол, 3-ацетилдеоксініваленол й 15-О-ацетил-4-деоксініваленол)



**Висновок.** Відповідно до наведених результатів можемо сказати, що 15-О-Ацетил-4-деоксініваленол, в порівнянні з іншими представленими мікотоксинами, здійснює найсильніший негативний вплив на клітини кишечника свині, що обумовлює істотне пригнічення його бар'єрної функції, яке може призвести до зниження місцевої імунної реакції та підвищення сприйнятливості до збудників інфекційних хвороб.

## Список літератури

1. Ахметов Ф. Г. Профилактика микотоксикозов у животных / Ф. Г. Ахметов, А. В. Иванов, М. Я. Трemasов // Ветеринария. - 2001. - № 2. - С. 47-50.
2. Волков М. Системний мікотоксикологічний контроль кормів – гарантія профілактики мікотоксикозів тварин та птиці / М. Волков // Вет. медицина України. – 2005. - № 3. – С. 20.
3. Гогин А. Е. Микотоксикозы: значение и контроль / А. Е. Гогин // Ветеринария. - 2006. - № 3. – С. 9-11.
4. Труфанова В. Частота контамінації мікотоксинами кормів для птиці / В. Труфанова // Вет. медицина України. – 2004. - № 9. – С. 26-28.
5. Хмельницький Г. О. Максимально допустимі рівні вмісту мікотоксинів у кормах для сільськогосподарських тварин та методи їх визначення / Г. О. Хмельницький, М. В. Волков.- К.: ГУВ МСГ і П України, 1997. – 1с.
6. D'Mello J. P. F. Fusarium mycotoxins: a review of global implications for animal health, welfare and productivity / J. P. F. D'Mello, C. M. Placinta, A. M. C. MacDonald // Anim. Feed Sci. Technol. – 1999.- N 80. – P. 183-205.
7. Degradation of trichothecene mycotoxins by chicken intestinal microbes /J. Christopher Young, Ting Zhou, Hai Yu. – 2006: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
8. Eriksen G. S. Comparative cytotoxicity of deoxynivalenol, nivalenol, their acetylated derivatives and deepoxy metabolites / G. S. Eriksen, H. Petterson, T. Lundh.- 2004: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
9. Fink-Gremmels J. Mycotoxins: their implications for human and animal health / J. Fink-Gremmels // Veterinary Quarterly. – 1999. – N 21. – P. 115-120.
10. Lipoprotein and apolipoprotein secretion by a newborn piglet intestinal cell line (IPEC-1) /R. Gonzalez-Vallina, H. Wang, R. Zhan [ et al.] // Am. J. Physiol.- 1996.- V. 271.- P. 249-259.
11. Mycotoxin fumonisin B1 alters the cytokine profile and decreases the vaccinal antibody titer in pigs / I. Taranu, D. E. Marin, S. Bouhet.- 2005: [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)
12. Characterization of a porcine intestinal epithelial cell line for in vitro studies of microbial pathogenesis in swine-/P. Schierack, M. Nordhoff, M. Pollmann [ et al.] //Histochem Cell Biol.- 2006, Mar.- V. 125(3).- P. 293-305. Epub 2005 Oct 8.
13. The mycotoxin fumonisin B1 alters the proliferation and the barrier function of porcine intestinal epithelial cells /S. Bouhet, E. Hourcade, N. Loiseau //Toxicol Sci.- 2004.- V.77(1).- P. 165-719 Epub 2003 Nov 4.
14. Sutton S. C. Simultaneous in vitro measurement of intestinal tissue permeability and transepithelial electrical resistance (TEER) using Sweetana-Grass diffusion cells.-1992.- N 9(3).- P. 31