

IMUNI ODZIV KAO POKAZATELJ POTREBA KOKOŠI NA VITAMINIMA
IV. UTJECAJ VITAMINA E NA IMUNI ODZIV I RAZVOJ IMUNOKOMPETENTNIH
ORGANA PILETA

IMMUNE RESPONSE AS A MARKER OF NEEDS ON VITAMINS IN CHICKEN
IV. THE INFLUENCE OF VITAMIN E ON THE IMMUNE RESPONSE AND DEVELOPMENT OF IMMUNE SYSTEM ORGANS IN CHICKENS

H. Mazija¹, Vlasta Šerman², Nora Mas¹, Estella Prukner-Radovčić¹

Izvorni znanstveni rad
UDK: 636.52/58-636.087.73
Primljeno: 3. 10. 1992.

SAŽETAK

Tri skupine tovnih pilića hranjene su različitim količinama vitamina E. Prva je skupina primala u početnoj smjesi 60, druga 90 i treća 120 IJ vitamina E, a u završnoj 50, 75, odnosno 100 IJ. Vakcinirani u dobi 14 dana protiv newcastleske bolesti, soj La Sota, uspoređeni su s kontrolnom grupom koja je u početnoj smjesi jela 30, a u završnoj 25 IJ vitamina E. Najbolji imuni odziv, mjereno HI titrom specifičnih antitijela, postigla je skupina što je primala najviše vitamina E. Kontrolna i pokusna skupina s 60 u početnoj i 50 IJ vitamina E u završnoj smjesi, jednako je reagirala na primijenjenu vakcinu. Najviši titar također postigla je skupina pilića s dodatkom najviše vitamina E (1:2⁵), uz linearni porast titra. U svih ostalih skupina nakon postignutog najvišeg titra u dobi 21 do 28 dana došlo je do njegova značajna pada. Indeks Fabricijeve burze, ocijenjen je u dobi 42 dana, bio je također najviši (1,796) i sličan indeksu u kontrolnih pilića (1,715). Skupine što su jele dvostruko i trostruko više vitamina E u hrani imale su niže indekse.

Nalaz, tumači se poticanjem imunokompetentnih organa i imunog odziva, ali tek s enormnom količinom vitamina E te se predlaže istraživanje uzroka potiskivanja razvoja Fabricijeve burze, što je zapaženo u pilića hranjenih povećanim ali ne enormno količina vitamina E u hrani.

UVOD I PODACI IZ LITERATURE

Uloga vitamina E (tokoferola) u organizmu peradi više-struka je. Djeluje ponajprije kao inhibitor autooksidacije lipida i tvorbe peroksida u staničnoj membrani. Istodobno vitamin E ima svojstvo uklanjanja slobodnih radikala što izazivaju peroksidaciju lipida. Postoji jaka i dobro upoznata sinergistička veza vitamina E i selen (Scott i sur. 1982). Selen također smanjuje količinu slobodnih radikala djelujući kao kofaktor u enzimu glutathion peroksidazi što reducira vodik-peroksid u vodu. Spomenuti sinergizam omogućuje da se, doduše ne u cjelosti, nedostatak vitamina E, može nadomjestiti selenom i obrnuto. Naročito je to uočljivo u bolesti što ih izaziva nedostatak ovih dviju tvari.

Hipovitaminozom E, samostalno ili praćena nedostatkom selen (je u peradi, očitovana kao više nozoloških entiteta. Odavno poznata je encefalomalacija u pilića od najmanje sedam do najviše 56 dana (Pappenheimer i sur., 1939). Eksudativna dijateza edem je tkiva potkožja nastao

zbog povećane propusnosti stijenke kapilara (Dam i Glavind, 1939). Treća je bolest mišićna distrofija u pilića te napose u pataka i purana (Austic i Scott, 1984), praćena nedostatkom sumpornih aminokiselina. U grudnom ali i drugom mišiću, lako se uoče uzdužni snopovi svijetlog distrofičnog tkiva. Konačno, poznato je otećenje skočnih zglobova purana (Scott, 1953) zbog nedostatka vitamina E i prisutnih lakooksidirajućih masti ili ulja.

Uloga vitamina E u razvoju i učinkovitosti imunog sustava nije potakla odgovarajuću pažnju istraživača. Napose zato što su, kako to navodi Cook (1991), brojni istraživači zanemarili ulogu selen ili koristili nestabilizirane oblike vitamina E (α tokoferol). Marsh i sur. (1981), koji su

¹Prof. dr. Hrvoje Mazija, Dr. Estella Prukner-Radovčić, znanstveni suradnik, Zavod za patologiju peradi, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 41000 Zagreb, Heinzelova 55.

²Prof. dr. Vlasta Šerman, mr. Nora Mas, asistent, Zavod za hranidbu, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, 41000 Zagreb, Heinzelova 55.

primijenili točno određene količine vitamina E i selena, našli su pak da njihov nedostatak umanjuje imuni odziv, ukoliko se koristi mala količina antigena. Učinak nije uočen s više antigena tvari. Istraživanja što su ih isti istraživači proveli na tovničkim pilićima dobi dva tjedna pokazala su da dodatak vitamina E i selena potiče imuni odziv. Tumačenje, dali su Marsh i sur. (1986), zapazivši da kombinirani nedostatak i vitamina E i selena oštećuje razvoj Fabricijeve burze, slezene i timusa, najznačajnijih limfoidnih organa odgovornih za imunokompetenciju. Mehanizam ovog djelovanja nije razjašnjen.

Više je rezultata istraživanja u kojima je dokazan i tumači se pozitivni učinak vitamina E na imunost u pilića. Tengerdy i sur. (1972) zapazili su da hipoksija potiče imunost, pa su pretpostavili da je antioksidantna aktivnost vitamina E osnova njegova povoljna učinka na imuni odziv. Doduše, taj se učinak zapaža kod značajno većih doza negoli su potrebne za optimalni rast i ostale fiziološke funk-

cije organizma kokoši. Sasvim različita je pretpostavka što su je desetak godina kasnije spomenuli Lawrence i sur. (1985). Oni su, temeljem nalaza Tangerdy i Browna (1977), da dodatak vitamina E potiskuje prostaglandine PGE1 i PGE2, potakli istraživanja prostaglandina s poznatim imunosupresivnim učinkom (PGE2, PGF2, 6 keto PGF1, tromboksan B2). Našli su da ih je manje u Fabricijevoj burzi pilića hranjenih s dodatkom vitamina E. Dodavanje prostaglandina spriječilo je opisani učinak vitamina E.

Istraživanja što su opisana trebala bi biti prilog boljem poznavanju učinka vitamina E na imuni odziv prema virusnom antigenu, vakcini newcastleske bolesti, prije svega zato da bi se poboljšala zaštita protiv te opake zaraze. Pored toga, virusni antigeni nisu dovoljno iskorišteni kao model istraživanja učinka vitamina E na imuni odziv pilića. Istodobno, imuni odziv pilića trebao bi poslužiti za bolje poznavanje njihovih potreba na tom vitaminu.

MATERIJAL I METODE

U pokusu korištene su četiri skupine po 30 tovnih pilića (Hybro), što su kao jednodnevni useljeni u zasebne kaveze (po dva za svaku). Svi su pilići hranjeni ad libitum komercijalnim smjesama za tov pilića (početna i završna) uobičajenog sadržaja selena (0,15 mg/kg) a različite količine stabilnog oblika vitamina E. Shematski, prikazujemo te količine po skupinama pilića u pokusu (Tablica 1).

Radi određivanja materalne imunosti s obzirom na newcastlesku bolest te učinka vakcinacije (u dobi 14 dana okulonazalno, »Pestikal« PLIVA, Zagreb), pilićima (po 10 iz svake skupine) izvađena je krv. Učinjeno i je to u dobi 1, 14, 21, 28, 35 te 42 dana života, kada je i pokus okončan.

REZULTATI

Zdravlje pilića u tijeku pokusa nije se izmijenilo, nije bilo očitovanih znakova bolesti. Uginula su dva krčljavca, a bakteriološkom pretragom izdvojene su uvjetno patogene bakterije (Koliformne bakterije, *Proteus vulgaris*, *Bacillus* sp.). Na primijenjenu vakcinu newcastleske bolesti nije bilo vakcinalne reakcije.

Rezultat pretrage krvnih seruma pilića u pokusu (HI titar) prikazan je tablicom 2.

Gotovo istovjetni je prosječni, za svo razdoblje pokusa, HI titar seruma pilića kontrolne i pokusne skupine I, što su u hrani jeli dvostruko više vitamina E, jednako u početnoj i završnoj hrani. Titar je tek neznatno viši u pokusne skupine I tjedan dana nakon vakcinacije, 28. dana se izjednačuje (4,1) a zatim je u kontrolnih pilića niži.

Pokusna skupina II prosječno se bolje imuno odazvala na primijenjenu vakcinu. Najviši HI titar seruma postigli su pilići 28 dana (14 dana nakon vakcinacije) kada iznosi 4,7 log₂, nakon čega opada ili se neznatno povećava.

Krvni serumi pretraženi su u probi inhibicije hemaglutinacije (IH), β postupkom dvostrukog serijskog razrjeđenja, s četiri hemaglutinacijske jedinice virus i 0,5% suspenzije eritrocita pijetla.

Jednako, po 10 pilića dobi 42 dana žrtvovano je, izvađene su im Fabricijeve burze te određen njen indeks (IB) jednadžbom:

$$IB = \frac{\text{masa F.b. (g)}}{\text{tjelesna masa (g)}} = 1000$$

Zdravlje pilića u pokusu nadzirano je svakodnevno klinički, uginuli i žrtvovani su razučeni, te pretraženi bakteriološki. Bakterije su izdvajane postupkom što ga opisuju Purchase i sur. (1989).

Pilići što su jeli najviše vitamina E (Pokus III) relativno su sporo reagirali na primijenjenu vakcinu newcastleske bolesti ali je postignuti HI titar u njih najviši (5,0 log₂) i bio u linearnom porastu. Zato je i prosječni HI titar u njih najviši te iznosi 4,32 log₂.

U svih pilića u pokusu prosječni HI titar seruma za virus newcastleske bolesti zadovoljava kriterij imunog jata (4,0 log₂).

Indeks fabricijeve burze pilića što su izračunati na kraju pokusa u dobi pilića 42 dana, prikazani su tablicom 3. Označene su prosječne vrijednosti za 10 burzi svake skupine u pokusu, pored toga i prosječna masa utovljenih pilića te masa Fabricijeve burze.

U prve dvije pokusne skupine (P I i P II), masa Fabricijeve burze manje su negoli u pilića kontrolne skupine a jednako i indeks burze. Jedino je u pilića hranjenih s najviše vitamina E i tjelesna masa i masa burze najveća, pa tako i njezin indeks. Bez obzira na ovu činjenicu, valja istaći da su



Količina vitamina E u hrani pilića u pokusu
The amount of vitamin E in feed of the experimental groups

Tablica 1./Table 1.

	Količina vitamina E u hrani (IJ) Početna smjesa (do 21. dana)	Količina vitamina E u hrani (IJ) Završna smjesa (od 21. dana)
Kontrola	30	25
Pokus I	60	50
Pokus II	90	75
Pokus III	120	100

Hemaglutinacijski titar seruma pilića u pokus (log2)
Hi titers in sera of the experimental chickens

Tablica 2./Table 2.

	Početna smjesa			Završna smjesa			
	Dob (dan)						
	1	14	21	28	35	42	0
Kontrola	3.7	4.0	4.5	4.1	4.0	4.2	4.08
Pokus I	3.7	3.3	4.6	4.1	4.3	4.3	4.05
Pokus II	3.7	4.0	4.4	4.7	4.2	4.5	4.25
Pokus III	3.7	4.0	4.2	4.3	4.7	5.0	4.32

Indeks Fabricijeve burze pilića hranjenih različitom količinom vitamina E
(u dobi 42 dana)
Index of burse Fabricius of chickens feed with diferent amount of vitamin E
(at 42 days of age)

Tablica 3./Table 3.

Pokusna skupina	Tjelesna masa pilića (g)	Masa Fabricijeve burze (g)	Indeks burze
Kontrola	1714,7	2,94	1,715
Pokus I	1675,2	2,79	1,665
Pokus II	1697,5	2,59	1,526
Pokus III	1792,4	3,22	1,796

svi indeksi burze vrlo niski i odgovaraju vrijednostima u pilića s očitovanom imunosupresijom. To se međutim ne odražava na polučenoj njihovoj masi pri kraju pokusa.

DISKUSIJA I ZAKLJUČCI

Vitamin E u različitim oblicima pripravaka dodaje se u hranu tovnih pilića. Jer, kako je poznato, mogućnost njegove sinteze u ptica općenito ne postoji. Djelujući zajedno sa selenom, sprječava oksidativne procese što su posljedica metaboličke razgradnje lipida. Osnovna mu je uloga da, kao kofaktor u enzimu glutathion peroksidaza, omogućuje redukciju peroksida u vodu. Nisu poznate hipervitaminoze E. Zna se međutim, da je njegov nedostatak u peradi osnova više bolesti, primjerice encefalomalacije u pilića (Pappanheimer i sur., 1939), eksudativne diateze (Dam i Glavind, 1939), mišićne distrofije u peradi (Austic i Scott, 1984), te oštećenja skočnih zglobova purana (Scott, 1953).

Njegovo djelovanje na razvoj i učinkovitost imunog sustava peradi, u manjoj mjeri je istraženo, zbog nestandardiziranja pokusa i zbog neuzimanja u obzir činjenice da vitamin E djeluje zajedno sa selenom (Cook, 1991; Marsh i sur., 1981). Specifično djelovanje na imunokompetentne organe u pileta, Fabricijeve burze, slezenu i timus, uočili su Marsh i sur. (1986), te dokazali da nedostatak vitamina E i selen a usporava njihov razvoj.

Istraživanje, opisano u ovom radu, potaknuto je općenito zamisli da imuni odziv posluži kao najobjektivniji pokazatelj zdravlja. Potreba na različitim neophodnim tvarima za rast i razvoj organizma, stavljena je u međuovisnost s razvojem imunokompetentnih organa te specifičnim odzivom na određeni antigen.

Tri pokusne skupine tovnih pilića što u hrani, početnoj i završnoj, jele najmanje dvostruko veću količinu vitamina E od preporučene, uz stalnu količinu selena, razlikovale su se međusobno u reakciji. Na primijenjeni antigen, vakcinu newcastlske bolesti, soj La Sota, svi su odgovorili pojačanom tvorbom specifičnih HI antitijela. Prosječno, taj je odziv bio proporcionalan količini vitamina E u hrani, no nisu uočene razlike između kontrolnih i pilića Pokusa I što su jeli 30 i 25 u početnoj, odnosno 50 i 60 IJ vitamina E u završnoj smjesi. Tek su male razlike izražene u indeksu burze što je u kontrole za svega 0,05 indeksnih vrijednosti veći.

Iako dvostruko, spomenuto povećanje količine vitamina E u hrani, nije se odnosilo niti na tvorbu antitijela niti na razvoj Fabricijeve burze. Trostruke količine vitamina E u hrani pokusne skupine II izazvale su, u odnosu na kontrolu, bolji prosječni imuni odziv (HI titar 1:2^{4.08} prema 1:2^{4.25}). Indeks burze, međutim, nešto je niži (1,526) negoli u kontrolnih (1,715) ili pilića pokusne skupine I (1,662). Bolji imuni odziv možemo tumačiti značajnim povećanjem količine vitamina E što, kako to navode Marsh i sur. (1981), te Tengerdy i sur. (1972), djeluje povoljno na imuni odziv.

Iako veće tjelesne mase (Tablica 3), pilići pokusne

skupine II, imali su relativno lakše Fabricijeve burze, zato i njen manji indeks. Razlike nisu značajne te mogu biti slučajne. Najbolji imuni odziv očitovali su pokusni pilići što su jeli najviše vitamina E. Prosječni heminhibicijski titar antitijela seruma za virus newcastlske bolesti iznosi 1:2^{4.32}, istodobno u te je skupine pilića polučen i apsolutno najviši titar (1:2^{5.0}) i to postupnim porastom do šestog tjedna pokusa. Ovo je različito od pilića svih ostalih skupina (K, P I, P II) u kojim je najviši HI titar polučen dva tjedna nakon vakcinacije, a zatim postupno opada (Tablica 2). Enormno velike količine vitamina E, 120 IJ u početnoj i 100 IJ u završnoj hrani pilića, potiču imuni odziv što se ovog puta može tumačiti njegovim inhibitorskim učinkom na prostaglandine, tvari poznatog imunosupresivnog djelovanja (Tengerdy i Brown, 1977). Indeks Fabricijeve burze veći je negoli u svih drugih pokusnih skupina pilića, jednako i tjelesna masa utovljenih pilića i masa same burze.

Opisanim istraživanjem potvrđene su spoznaje o učinku vitamina E na imuni odziv i razvoj bar jednog ali najznačajnijeg imunokompetentnog organa, Fabricijeve burze. Rezultati su međutim jasno naznačili da relativno male (inače preporučene u praksi) količine vitamina E djeluju slično. Ostaje da se razjasni zašto su znatno ali ne i enormno veće doze vitamina E (Pokus I i Pokus II) djelovale povoljno jedino na humoralni imuni odziv, a ne i na tjelesnu masu utovljenih, pilića te na masu Fabricijeve burze. Biti će to sadržaj daljnjih istraživanja.

Literatura

1. AUSTIC, R. E., M. L. SCOTT (1984): Nutritional deficiency diseases. U: Diseases of poultry, 8th ed. (M. S. HOFSTAD, Ed.). Iowa State University Press, Ames, Iowa, str. 46-49.
2. COOK, M. E. (1991): Nutrition and the immune response of the domestic fowl. Crit. Rev. Poultry Biol. 3: 167-189.
3. DAM, H., J. GLAVIND (1939): Alimentary escudative diathesis, a consequence of E-avitaminosis. Nature, Lond. 143: 810-811.
4. LAWRENCE, L. M., M. M. MATHIAS, C. F. NOCKEIS, R. P. TENDERDY (1985): The effect of vitamin E on prostaglandin levels in the immune organs of chicks during the course of an E. coli infection. Nutr. Res. 5: 497.
5. MARSH, J. A., R. R. DIETERT, G. F. COMBS JR (1981): Influence of dietary selenium and vitamin E on the humoral immune response of chick. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 166: 228.
6. MARSH, J. A., G. F. COMES, M. E. WHITACRE, R. R. DIETERT (1986): Effect of selenium and vitamin E dietary deficiencies on chick lymphoid organ development. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 182: 425.
7. PAPPENHEIMER, A. M., M. GOETTSCH, E. JUNGHER (1939): Nutritional encephalomalacia in chicks and certain related disorders of domestic birds. Bull. Starrs. Agric. Exp. Sta. 229: 121.
8. PURCHASE, H. G., L. H. ARP, C. H. DOMERMUTH, J. E. PEARSON (1989): A laboratory manual for the isolation and identification of avian pathogens, 3rd ed. The American Association of Avian Pathologists, New Bolton Center, Pennsylvania.
9. SCOTT, M. L. (1953): Prevention of the enlarged hock disorder.



- der in turkeys with niacin and vitamin E. Poultry Sci. 32: 670-677.
10. **SCOTT, M. L., M. C. NESHEIM, R. J. YOUNG** (1982): Nutrition of the chicken, 3rd ed., M. L. Scott and Assoc., Ithaca NY.
 11. **TENDERDY, R. P., R. H. HEINZERLING, C. F. NOCKELS** (1972): Effect of vitamin E on the immune response of hypoxic and normal chickens. Inf. Immunity 5: 987.
 12. **TENDERDY, R. P., J. C. BROWN** (1977): Effect of vitamin E and A on humoral immunity and phagocytosis in E. coli infected chicken. Poultry Sci. 56: 957.

ABSTRACT

The groups of fattening chickens were fed with different amounts of the vitamin E in starter and finisher feed. First group received 60 IU in starter and 50 IU in finisher feed, second group 90 IU in starter and 75 IU in finisher and third group 120 IU in starter and 100 IU in finisher feed. Chickens were vaccinated at 14 days of age for a Newcastle disease, strain La Sota. Immune responses were compared to a control group which received 30 IU in starter and 25 IU of vitamin E in finisher. The best immune response measured by HI titres of specific antibodies had the group with the highest amount of vitamin E. Control group and experimental groups with 60 and 50 IU of vitamin E in finisher feed had the same response to vaccinations. Group which received the highest amount of vitamin E had the best linearly increased titers (1:2⁵).

Titers in all other groups after age of 21 days started to decrease until the 28th day. Index of bursa Fabricius measured at age of 42 days was the highest (1.796) and similar to results of control group (1.715). Groups which received 2 or 3 times more of vitamin E in feed had similar indices.

These findings could be explained by stimulation of immune system organs and immune responses with enormous amounts of vitamin E. The reasons for a poor development of bursa noticed in chickens fed very high but not amounts of vitamin E need to be investigated in a future research.