

DJELOVANJE AKUTNIH TOPLINSKIH STRESOVA NA RAZVOJ IMUNOKOMPETENTNOG SUSTAVA U TOVNIH PILIĆA

Histopatološke promjene Fabricijeve burze i slezene

Marina Tišljar, M. Mikec, Perica Pavičić, V. Savić

Sažetak

Učinak akutnih toplinskih stresova na razvoj Fabricijeve burze i slezene istražen je tijekom 42-dnevnog pokusnog tova pilića teške linije Hybro. Pilići pokusne skupine izloženi su 5., 12., 16., 34. dana života 12-satnom toplinskom stresu (povišenje temperature 7-9°C). Utvrđena iscrpljenost limfoidnog tkiva srži folikula i hiperplazija epitela sluznice praćena invaginacijom promjene su koje upućuju na pojavu slabijeg do jakog stupnja atrofije Fabricijeve burze. Promjene su se pojačavale usporedno s porastom životne dobi pilića, odnosno s brojem provedenih toplinskih stresova tijekom pokusa. Histološka slika slezene obiju skupina upućivala je na fiziološki razvoj organa te nisu uočene razlike između kontrolne i pokusne skupine pilića.

Uvod

Sposobnost pravilnog djelovanja obrambenog sustava ptica ovisi o očuvanosti primarnih imunokompetentnih organa (Fabricijeve burze i timusa) kao i o djelovanju sekundarnih, perifernih organa - slezene, Harderove žlijezde i cecalnih tonzila (Glick, 1978; Seto, 1981).

Najčešće dosad pokusno izvedeni stresovi u peradi s istraživanim učinkom na obrambeni sustav jesu: toplina, prenapučenost, hladnoća, ograničenje hrane, buka, restraint. Svi ovi stresovi povećavaju ili smanjuju imunosni odgovor. Posljedica djelovanja različitih stresora jest opći adaptacioni sindrom (Seyle, 1936) tijekom kojeg se povećava tvorba glukokortikoida. Osim glukoneogenetskog glukokortikoidi imaju izrazito protuupalni i imunosupresivni učinak (Dohms i Metz, 1991). Pitanje preosjetljivosti peradi na glukokortikoide (Claman, 1988) dobiva odgovor u rezultatima primjene kortikosterona: smanjenje mase limfoidnog tkiva i prijevremena involucija Fabricijeve burze (Garroni i Schaffner, 1956; Glick, 1967).

Sekundarni limfoidni organi odgovaraju na stimulaciju antigenom i ne podliježu involuciji. Splenektomijom se bitno ne smanjuje obrambena sposobnost životinje, ali

Mr. Marina Tišljar, veterinar, znanstveni asistent, Milivoj Mikec, veterinar, znanstveni asistent, Perica Pavičić, veterinar, mladi istraživač, Vladimir Savić veterinar, stručni suradnik, Hrvatski veterinarski zavod, Zagreb.

je poremećen mehanizam prezentacije antigena (T i z a r d, 1982).

Najbrojnija istraživanja tiču se posljedica toplinskog stresa na imunosni odgovor (S u b b a R a o i G l i c k, 1970; T h a x t o n i S i e g e l, 1973; M o r g a n i sur., 1976; T h a x t o n, 1978), no ni u jednom od dostupnih radova ne nalazimo prikaz histoloških promjena Fabricijeve burze i slezene pilića izloženih toplinskom stresu. Tek su D o h m s i M e t z (1991), davanjem različitih doza kortikosterona pilićima, nastojali oponašati posljedice stresa koje su proučavali histopatološkom pretragom timusa, slezene i Fabricijeve burze.

Stoga smo učinak višekratnog akutnog toplinskog stresa na razvoj imunokompetentnih organa utvrđivali histopatološkom pretragom Fabricijeve burze i slezene prvog, trećeg do četvrtog i sedmog dana nakon primjene toplinskog stresa.

Materijal i metode

Istraživanje je provedeno na 400 pilića linije Hybro obaju spolova tijekom prvih 42 dana života. U dobi od jedan dan pilići su smješteni u jednu skupinu, a od drugog dana života do kraja pokusa razdvojeni u zasebne prostorije iste nastambe za perad na kontrolnu i pokusnu (stresiranu) skupinu (po 200 u svakoj). Pilići su držani na podu, a kao prostirka poslužio je papir i strugotine drva. Obje skupine hranjene su po volji istovrsnom hranom za tovne piliće. Ritam i stupanj osvjetljenosti u obje skupine provedeni su prema preporuci proizvođača. Pokazatelji mikroklimе utvrđivani su termohigrografom, a zasićenost štetnim plinovima Dragerovim uređajem i cjevčicama. Koncentracija CO₂ nije prelazila 0,05 vol%, a amonijak se kretao u koncentraciji od 0 - 5 ppm. Dvanaestog dana života pilići su imunizirani protiv newcastleske bolesti okulonazalno živom lentogenom vakcinom izrađenom iz soja La Sota (Pestikal, "Pliva" Zagreb). Tijekom pokusa zdravstveno stanje pilića praćeno je kliničkom pretragom; uvidom u dnevno uginuće, ukupni utrošak hrane i iznos prosječne tjelesne tjedne mase (uzorak od 20 pilića). Prirast tjelesne mase obrađen je T-testom na razini značajnosti $P < 0,01$.

Stresirana skupina pilića bila je izložena 5., 12., 16., 34. i 35. dana 12-satnom toplinskom stresu tijekom kojeg je temperatura okoliša bila 7 - 9°C viša od optimalne (umjereni ili blagi toplinski stres). Od tri pileta iz stresirane i kontrolne skupine uzimani su Fabricijeva burza i slezena za histološku pretragu 1., 6., 8., 12., 15., 19., 23., 26., 30., 34., 37. i 41. dana (prvog, trećeg do četvrtog i sedmog dana nakon stresa). Organi su fiksirani u 10-postotnom formalinu i uklapani u parafin vosak. Parafinski blokovi rezani su rotacionim mikrotonom na rezove debljine 5 µm i bojani metodom hemalaun-eozin.

Rezultati

Uspjeh tova

Ukupno uginuće do kraja tova u stresiranoj skupini iznosilo je 3%, a u kontrolnoj 0,5%, što je u oba slučaja bilo manje od tehnološki očekivanog normativa (do 5%)

Tab. 1 - PROSJEČNE TJELESNE MASE PILIĆA PO SKUPINAMA (gr)

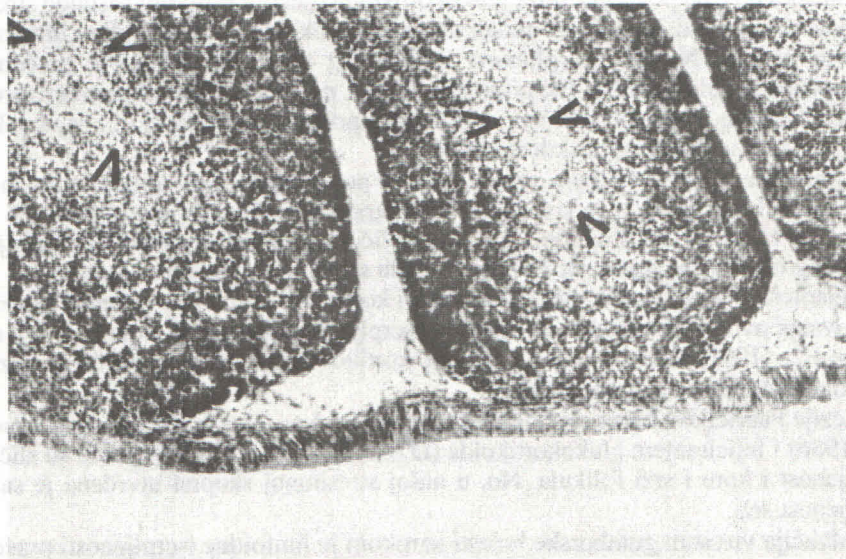
Dob u tjednima	Stresirana skupina	Kontrolna skupina
1	135,8	134,6
2	346,1	354,3
3	682,1	687,5
4	1179,0	1215,5
5	1650,5	1683,1
6	2002,4	2059,1

Nastala razlika u tjednim tjelesnim masama između skupina statistički nije značajna. Prijetvor hrane u tjelesnu masu u pilića pokusne, odnosno kontrolne skupine iznosi 1.992, odnosno 1.953.

Razudbom pilića uginulih tijekom pokusa utvrđene su traumatske ozljede s posljedičnim iskrvarenjem; ugušenje i erozije kutikule mišićnog želuca, a poslije 20. dana života pretežito srčana kap. Bakteriološkom pretragom jetara dobiven je negativan rezultat.

Histopatološki nalaz Fabricijeve burze i slezene pilića pokusne i kontrolne skupine prikazani su na tablicama 1 i 3.

Slika 1 prikazuje histopatološke promjene folikula Fabricijeve burze (dob pileta: 37 dana).



SI. 1 - FABRICIJEVA BURZA PILETA ŠTRESIRANE SKUPINE (DOB: 37 DANA) IZRAŽENA ISCRPLJENOST LIMFOIDNOG TKIVA SRŽI FOLIKULA (HEMALAUN-EOZIN; POVEĆANJE 10X20).

Razmatranje i zaključci

Fabricijeva burza pilića u dobi od jedan dan pokazuje nalaz tipičan za tu dob (tablica 1). Još ne postoji mikroskopski uočljiva razlika kora-srži, a brojni prazni prostori vidljivi unutar folikula zaostaju od mrtvih makrofaga. Fiziološki je uobičajen i nalaz heterofila u istom omjeru kao i limfoidnih stanica prvih 24 sata nakon leženja pilića (L u c a s i J a m r o z, 1961; R i d e l l, 1987). Šestog i osmog dana pokusa (24 i 72 sata nakon prvog akutnog toplinskog stresa) uočljiva je jedva primjetna difuzna iscrpljenost limfoidnog tkiva srži folikula Fabricijeve burze (stresirana skupina-tabl. 1). U slezeni umjesto heterofila utvrđenih prvog dana života, analiziramo 6. dana života difuzno gušći raspored limfoidnih stanica stresora skupina - tabl. 2). Zametna središta nalazimo od 15. dana nadalje, a začetak njihova stvaranja 8. dana života. R i d e l l (1987) uočava prvu pojavu zametnih središta oko 10. dana života pilića i znatno smanjenje njihova broja nakon davanja kortikosteroida. Za razliku od njega, stariji aurori (T h o r b e c k e i sur., 1957) smatraju fiziološkim nalaz zametnih središta tek u dobi iznad četiri tjedna i njihovu odsutnost u SPF pilića.

Od slabije primjetne iscrpljenosti limfoidnog tkiva srži folikula Fabricijeve burze stresirane skupine 6. i 8. dana života (24 i 72 sata nakon prvog stresa), istu pojavu pratimo kao primjetnu 12. i 19. dana, kao vidljivu 26. i 34. dana te kao izrazitije vidljivu 37. i 41. dana života (tabl. 1). Sličan nalaz D o h m s i M e t z (1991) utvrđuju 1., 3. i 6. dana nakon davanja 50 mg/kg/dan ili 5 mg/kg/dan kortikosterona pilićima tijekom 6 dana. Primjenom farmaceutski utvrđenih doza (koje su prema istim autorima vjerojatno daleko niže od povećane doze glukokortikoida tijekom prirodno nastalog stresa) nastojala se dokazati osjetljivost peradi na glukokortikoide kao i na njihov imunosupresivni učinak. Nastala iscrpljenost limfoidnog tkiva burze bila je praćena i promjenama epitela sluznice. Iste promjene epitela, praćene slabije primjetnom atrofijom srži folikula burze, utvrdili smo 6. i 8. dana pokusa, odnosno 1. i 3. dana nakon prvog u nizu izvedenih toplinskih stresova.

Limfoidna atrofija folikula pojačava se s povećanjem dobi pilića, odnosno s povećanjem broja uzastopce izvedenih kratkotrajnih toplinskih stresova. S u b b a R a o i G l i c k (1970) nalaze smanjenu količinu protutijela posljedično primjeni kroničnog toplinskog stresa, što bi bilo u skladu s našim histološkim nalazom.

Histološki nalaz slezene pilića stresirane i kontrolne skupine pokazuje fiziološko oblikovanje ovog organa (tabl. 2). Znakove iscrpljenja bijele pulpe, koje su D o h m s i M e t z (1991) nalazili nakon primjene kortikosterona, nismo utvrdili u slezeni kontrolne i stresirane skupine (tabl. 2).

Lezije Fabricijeve burze nastale djelovanjem *Escherichiae coli* (N a k a m u r a i sur., 1986) i injiciranjem glukokortikoida (D o h m s i M e t z, 1991) vrlo su slične: iscrpljenost i kore i srži folikula. No, u našoj stresiranoj skupini utvrđena je samo iscrpljenost srži.

Infekcija virusom gumborske bolesti uzrokom je limfoidne iscrpljenosti praćene fibroplazijom i hiperplazijom retikularnih stanica, nabiranjem epitela i pojavom intraepitelnih cisti (L u k e r t i S a i f, 1991). Atrofija folikula i degenerativne promjene epitela nisu bile praćene fibroplazijom ili hiperplazijom retikularnih stanica u našim nalazima.

Tab. 2 - HISTOPATOLOŠKI NALAZ FABRICIJEVE BURZE STRESIRANE I KONTROLNE SKUPINE PILIĆA

DOB PILIĆA	STRESIRANA SKUPINA	KONTROLNA SKUPINA
1.*	Neprepoznatljiva razlika između kore i srži; heterofili u intersticiju i rubno području folikula; raspršeni "prazni" prostori unutar folikula (ostaci mrtvih makrofaga)	
6.	Slabije primjetna difuzna iscrpljenost limfoidnog tkiva srži folikula; ograničena hiperplazija i invaginacija epitela	Promjene se odnose samo na epitel: kao u pokusnoj skupini, ali manjeg stupnja jakosti
8.	Nalaz odgovara nalazu 6. dana pokusne skupine; promjene epitela obuhvaćaju i uočljive pojedinačne ciste unutar epitela	Nalaz odgovara nalazu iste skupine 6. dana života
12.	Primjetna iscrpljenost limfoidnog tkiva srži	Nalaz odgovara prethodnom iste skupine.
15.	Promjene epitela kao 6. i 8. dana iste skupine ali slabije izražene	Nalaz odgovara prethodnom iste skupine.
19.	Primjetna iscrpljenost limfoid. tkiva srži; ostalo (epitel) kao 15. dana iste skupine	Nalaz odgovara prethodnom iste skupine.
23.	Epitel kao 15. dan iste skupine	Nalaz odgovara prethodnom iste skupine.
26.	Vidljiva difuzna iscrpljenost limfoid. tkiva srži; ostalo kao 23. dan pokusne skupine	Nalaz odgovara prethodnom iste skupine.
30.	Kora i srž; nalaz na epitelu odgovara dosad navedenom	Nema promjena
34.	Nalaz odgovara nalazu utvrđenom 26. dan u pokusnoj skupini	Nema promjena
37.	Izražena limfoidna iscrpljenost srži folikula; ostalo kao 15. dan	Nema promjena
41.	Nalaz odgovara nalazu od 37. dana	Nalaz odgovara nalazu od 6. dana iste skupine

* - u pilića u dobi od jedan dan života nema razlike između kontrolne i pokusne skupine

Nepravilnost pojave histoloških promjena limfoidnog tkiva Fabricijeve burze (15., 23. i 30 dan nema promjene u pokusnoj skupini-tabl. 1) ne možemo proglasiti isključivom posljedicom dobi pilića. Pojava atrofije srži folikula najvjerojatnije je posljedica utjecaja višekratnog toplinskog stresa na ovaj organ. Fiziološki nalaz Fabricijave burze 15. i 23. dana (tri i sedam dana nakon stresiranja) možemo pripisati biološkoj raznolikosti unutar istraživanog uzorka. Istovrsni nalaz burze trideseti dan (četnaesti dan nakon stresiranja) najvjerojatnije je posljedica fiziološkog obnavljanja organa.

Histološki nalaz burze 12. dana života (primjetna limfoidna iscrpljenost), kada su pilići vakcinirani protiv newcastleske bolesti (uz činjenicu da je potpuni razvoj termoregulatornog kapaciteta pilića završen tek u dobi od dva do tri tjedna života; O s b a l d i s t o n, 1968), mogao bi nagovijestiti mogućnost smanjenog imunskog odgovora pilića nakon prvog u nizu akutnih toplinskih stresova i istodobno primijenjene vakcinacije.

Histopatološkom pretragom slezene obiju skupina pilića nismo uočili razlike

između pokusne i kontrolne skupine pa se iz toga može zaključiti da je ovaj organ manje podložan stresu u odnosu na Fabricijevu burzu.

Rezultate razudbe i bakteriološke pretrage tijekom pokusa ne možemo povezati s histopatološkim nalazom burze i slezene.

Table 3 - HISTOPATOLOŠKI NALAZ SLEZENE STRESIRANE I KONTROLNE SKUPINE PILIĆA

DOB PILIĆA	STRESIRANA SKUPINA	KONTROLNA SKUPINA
1.*	Heterofili i limfoidne stanice jednakomjerno raspoređene	
6.	Difuzno gušći raspored limfoidnih stanica	Nalaz kao u pokusne skupine
8.	Začetak stvaranja limfoidnih folikula (zametnih središta)	Nalaz kao u pokusne skupine
12.	Začetak stvaranja limfoidnih folikula (zametnih središta)	Nalaz kao u pokusne skupine
15.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
19.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
23.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
26.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
30.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
34.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
37.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine
41.	Rijetko raspršena zametna središta	Nalaz kao u pokusne skupine

* - u pilića u dobi od jedan dan života nema razlike između pokusne i kontrolne skupine

LITERATURA

1. Claman, H.N. (1988): Corticosteroides and the immune response. In: Chrousos, G.P., D.L. Loriaux and P.W. Gold (Edit.) Mechanism of physical and emotional stress. Plenum Press, New York: 203-208.
2. Dohms, J. E. and A. Metz (1991): Stress - mechanisms of immunosuppression. Vet. Immunol. Immunopathol., 30: 89-109.
3. Garren, H.W. and C.S. Schaffner (1956): How the period of exposure to different stress stimuli affects the endocrine and lymphatic gland weights of young chickens. Poult. Sci., 35: 266-272.
4. Glick, B. (1967): Antibody and gland studies in cortisone and ACTH-injected birds. J. Immunol., 98: 1076-1078.
5. Glick, B. (1978): Immune response in the chicken lymphoid development of the bursa of Fabricius and thymus and an immune response role for the gland of Harder. Poult. Sci., 57: 1441-1444.
6. Lucas, A.M. and C. Jarnoz (1961): Atlas of Avian Hematology, Agricultural Monograph. No. 25. V.S. Dept. Agricult. Washington.
7. Lukert, P.D. and Y. M. Saif (1991): Infectious bursal disease virus. In: Calnek, B.W., H.J. Barnes, C.W. Beard, W.M. Reid and H.W. Yoder, Jr (Edit.): Disease of Poultry. Iowa State University Press, Ames, IA: 648-663.
8. Morgan, G. W., P. Thaxton and F. W. Edens (1976): Reduced symptoms of anaphylaxis in chickens by ACTH of heat. Poult. Sci., 55: 1498-1504.
9. Nakamura, K., Y. Imada and M. Maeda (1986): Lymphocyte depletion of bursa of Fabricius and thymus in chickens inoculated with Escherichia coli. Vet. Pathol., 23: 712-717.

10. O s b a l d i s t o n, G.W. (1968): The effect of climate on the growth performance of populations of broiler chickens. *Br. vet. J.*, 124: 56-68.
11. R i d e l l, C. (1987): Avian histopathology. American Assoc. Avian pathol. Kenett Square, PA: 7-17.
12. S e t o, F. (1981): Early development of the avian immune system. *Poult. Sci.*, 60: 1981-1995.
13. S e y l e, H. (1936): The alarm reaction. *Can. Med. Assoc. J.*, 706.
14. S u b b a R a o, D.S. V. and B. G l i c k (1970): Immunosuppressive action of heat in chickens. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 133: 445-448.
15. T h a x t o n, P. and H.S. S i e g e l (1973): Modification of high temperature and ACTH induced immunosuppression by metyrapone. *Poult. Sci.*, 52: 618-624.
16. T h a x t o n, P. (1976): Influence of temperature on the immune response of birds. *Poult. Sci.*, 57: 1430-1440.
17. T h o r b e c k e, G. J., H.A. G o r d o n, R. W o s t m a n, M. W a g n e r and J.A. R e y n i e r s (1957): Lymphoid tissue and serum globulins in young germ-free chickens. *J. Infect. Dis.*, 101: 237-251.
18. T i z a r d, I. (1982): An introduction to veterinary immunology. 2nd ed.: Saunders Comp.: Philadelphia-London-Toronto- Mexico City-Rio de Janeiro-Sydney-Tokyo.

EFFECT OF ACUTE THERMAL STRESSES ON THE DEVELOPMENT OF IMMUNOCOMPETENT SYSTEM OF FATTENING CHICKENS

Histopathological examination of the bursa of Fabricius and the spleen

Summary

The study relates to the effect of multiple acute thermal stresses on the histologic picture of the bursa of Fabricius and spleen (Hybro chicks) during the experimental period of 42 days. The chicks were exposed to 12 hours of warm stress on 5th, 12th, 16th, 34th and 35th day of life (the temperature was increased 7°C to 9°C). The appearance of lymphoid depletion of follicular medulla of bursa of Fabricius and the epithelial hyperplasia followed by invagination characterised a low to high degree of atrophy. Higher degree of bursal atrophy was observed toward the number of multiple acute thermal stresses. The histological findings of the spleen of experimental and control groups physiological development.

Primljeno: 13. 5. 1994.