

# Ocena toksyczności litu i selenu dla zarodków i jednodniowych piskląt kurzych

PIOTR SZELESZCZUK, EWA KARPIŃSKA, WOJCIECH BIELECKI,  
GRAŻYNA KOSOWSKA, WANDA BORZEMSKA

Katedra Nauk Klinicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Ciszewskiego 8, 02-786 Warszawa

Szeleszczuk P., Karpińska E., Bielecki W., Kosowska G., Borzemska W.

## Evaluation of lithium and selenium toxicity for chicken embryos and one-day-old chicks

### Summary

The acute toxicity of selenium (sodium selenite) and lithium (lithium chloride) was evaluated using 6-day-old chicken embryos and 1-day-old male chicks. The substances, at various concentration rates, were introduced into the yolk sac in case of embryos, or into the crop in the case of chicks. Clinical symptoms and anatomopathological changes were examined and deaths were recorded in the case of the birds. The chicks were weighed on the 7th day of their lives. The embryos were observed until the 18th day of incubation. Samples from internal organs of dead and killed birds were collected for histopathological examination on the last day of the experiment. After the period of incubation embryos were chilled to determine their weight and the length of the shanks, and to examine macroscopic changes in internal organs. Lithium chloride administered in the amount of 30 mg per head (III group) caused the death of embryos within 72-168 h p.i.; at the same dose deaths of chicks occurred much earlier – between 12 and 24 h p.i. Lower body weight and shorter shanks ( $p < 0.01$ ) were observed for embryos treated with lithium chloride in the amount of 6 mg per head. The lowest doses of the preparation (0.6 mg per head) caused a proliferation of lymphatic tissue in the immunological system of chicks. Selenium ions (sodium selenite) administered in the amount of 0.02 mg per embryo (III group) caused the death of all embryos within 48 hours, whereas for chicks the lethal dose was 100 times higher (2 mg). Similarly to lithium, even the lowest dose of sodium selenite (0.0002 per chick) caused proliferation of lymphatic organ in the bursa of Fabricius.

**Keywords:** chicken embryos, lithium, selenium

Immunosupresja ma istotne znaczenie praktyczne w produkcji drobiarskiej. Wpływa ona negatywnie na stan zdrowotny ptaków i prowadzi do obniżenia wyników produkcyjnych (20, 24). Liczba agresorów środowiskowych zaburzających immunohomeostazę organizmu ptaków jest bardzo duża, a ich eliminacja nie zawsze możliwa (12). Czynniki biologiczne, a wśród nich wirusy o działaniu immunosupresyjnym, należą do najważniejszych przyczyn zaburzających prawidłowe funkcjonowanie układu odpornościowego (10, 20). Prowadzone na szeroką skalę szczepienia profilaktyczne drobiu są skuteczną metodą ograniczenia ich patogenego działania. Jednak, pomimo prowadzonych szczepień, groźne pozostają dla drobiu wirusy: zakaźnej anemii kur (Chicken Infectious Anemia – CIA) (1, 10), zakaźnego zapalenia bursy Fabrycjusza (Infectious Bursal Disease – IBD) (10, 19) oraz choroby Mareka (Marek Disease – MD) (10, 18).

Jedną z praktycznych metod osłony równowagi układu odpornościowego organizmu może być stosowanie preparatów farmakologicznych (3, 4, 13, 21). Rozwój immunologii stwarza rosnące możliwości w tym

zakresie (11, 13). Można sądzić, że stosowanie bezpiecznych, efektywnych i tanich immunomodulatorów rozwiąże wiele problemów intensywnej produkcji drobiarskiej. Na podstawie przeglądu piśmiennictwa, z obszerniej listy aktualnie dostępnych immunomodulatorów, wyselekcjonowano preparaty, które mogą znaleźć zastosowanie w drobiarstwie (3, 11, 15, 17). Wydaje się, że wymogi dobrego immunostymulatora dla potrzeb produkcji drobiarskiej mogą spełnić zwłaszcza: lewamizol, izoprinozina, jony selenu oraz jony litu. Wprowadzenie tych preparatów do powszechnego użytku u drobiu powinno być poprzedzone ustaleniem ich potencjalnej toksyczności dla zarodków i piskląt kurzych. We wcześniejszych badaniach własnych określono ostrą toksyczność lewamizolu i izoprinozyny dla zarodków i piskląt kurzych (22), natomiast celem niniejszych badań było określenie toksyczności jonów litu i selenu.

### Materiał i metody

**Pisklęta i jaja wylęgowe.** Do doświadczeń użyto 1-dniowych kogutków oraz jaj wylęgowych krzyżówki Hybro G.

Zważone, zaobrączkowane i podzielone na grupy ptaki w czasie eksperymentu żywiono standardową mieszanką dla kurcząt rzeźnych. Jaja wylęgowe inkubowano w inkubatorze laboratoryjnym (Coudelou – Francja) w warunkach przewidzianych dla lęgów kurzych.

**Immunomodulatory.** Do badań użyto chlorku litu (Sigma, USA) i seleninu sodu (Difco, USA).

**Przebieg doświadczeń.** Dla każdego badanego preparatu utworzono 6 grup liczących po 6 piskląt w każdej grupie. W tab. 1-2 podano szczegółowe dane o poszczególnych preparatach i grupach.

Rozcieńczenie ocenianych immunomodulatorów sporządzano w *aqua pro iniectio* i podawano sondą do wola 1-dniowym kogutkom. Pisklęta obserwowano przez 7 dni. W 7. dniu życia pisklęta ważono. Notowano objawy kliniczne, czas padnięcia oraz zmiany anatomopatologiczne. Od ptaków padłych i wykrwawionych w ostatnim dniu obserwacji pobierano wycinki narządów do badań histopatologicznych. Ocenie podlegały następujące narządy: mózg, serce, płuca, nerki, żołądek gruczołowy i mięśniowy, dwunastnica, trzustka, wątroba, grasicca, śledziona, bursa Fabricjusza oraz mięśnie szkieletowe. Pobrane wycinki utrwalano w 10% formalinie. Sporządzone następnie skrawki parafinowe barwiono metodą HE (hematoksylina-eozyna). W celu wykrycia obecności tłuszczów mrożone skrawki wątroby barwiono Sudanem III. Preparaty histopatologiczne oceniano w mikroskopie świetlnym Olympus BX 50 przy powiększeniach 50 ×, 100 ×, 200 ×.

Ocenę embriotoksyczności badanych preparatów przeprowadzono na zarodkach kurzych. Sporządzone rozcieńczenia immunomodulatorów w koncentracjach takich samych jak dla piskląt sterylizowano przy użyciu filtrów

(Millipore – USA) i podawano dożółtkowo 6-dniowym embrionom. Ogółem użyto 140 zarodków licząc 60 zarodków dla każdego preparatu oraz 10 embrionów dla każdej kontroli. Inokulowane jaja świetlono co 24 godziny i notowano czas zamierania embrionów. W 18. dniu inkubacji zarodki schładzano i określono masę ciała, długość skoku i zmiany makroskopowe w narządach. Wyniki liczbowe oceny piskląt oraz zarodków opracowano statystycznie przy użyciu testu t-Studenta.

## Wyniki i omówienie

W piśmiennictwie nie znaleziono szczegółowych badań nad wpływem jonów litu na pisklęta i zarodki kurze. Wyniki badań własnych (tab. 1) wskazują, że śmiertelność zarodków zaczyna się przy dawce 30 mg (grupa III). W grupach I i II nie notowano upadków piskląt. Toksyczny wpływ jonu litu zauważono już u zarodków z grupy II. Miały one niższą masę ciała i krótszy skok ( $p < 0,01$ ). Przy dawce 30 mg/szt. w czasie 72-168 h zamarło 100% zarodków, a w czasie 12-24 h padły również wszystkie pisklęta. Klinicznie, przed zejściem występowała u ptaków senność, wielomocz oraz trudności w oddychaniu. Sekcyjnie u padłych piskląt stwierdzono bardzo silne przekrwienie błony śluzowej wola oraz przekrwienie nerek, wątroby, płuc, jak również obrzęk i przekrwienie mózgu. Obserwacje mikroskopowe układu limfatycznego piskląt, które traktowano chlorkiem litu wykazały, że niższe dawki tego preparatu powodują proliferację tkanki limfatycznej. Zmiany te były widoczne szczególnie w bursie Fabricjusza piskląt z grup I (ryc. 1) i II. Ob-

Tab. 1. Wpływ chlorku litu na zarodki i pisklęta kurze

Grupa Obiekt badania	I		II		III		IV		V		k	
	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P
Dawka mg/szt.	0,6	0,6	6,0	6,0	30,0	30,0	x	60,0	x	600,0	PBS	PBS
Czas zamarcia (h)	-	-	-	-	72-168	12-24	x	7-12	x	0,6-1,5	-	-
Śmiertelność (%)	0	0	0	0	100	100	x	100	x	100	0	0
Masa ciała – pisklęta 7-dniowe (g)	25,5 ± 1,19	51,6 ± 4,8	22,13 ± 2,9	52,1 ± 2,1	x	x	x	x	x	x	25,7 ± 2,13	54,3 ± 5,6
Długość skoku (mm)	1,98 ± 0,09	x	1,88 ± 0,19 *	x	x	x	x	x	x	x	2,18 ± 0,09	x

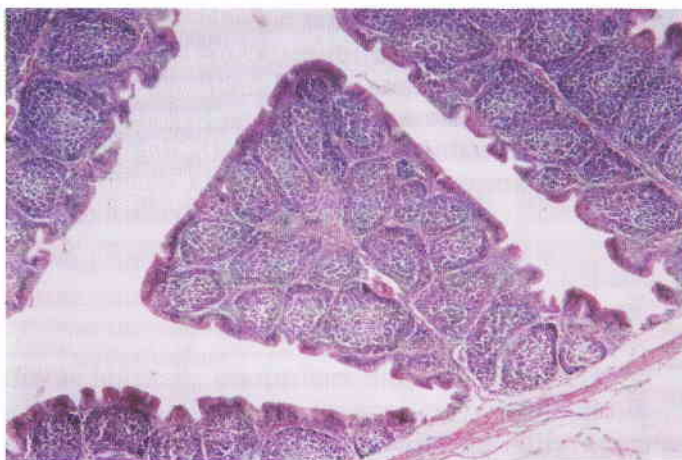
Objaśnienia: Z – zarodki, P – pisklęta, \* różnica statystycznie istotna przy  $p < 0,01$ , x – nie badano

Tab. 2. Wpływ seleninu sodu na zarodki i pisklęta kurze

Grupa Obiekt badania	I		II		III		IV		V		k	
	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P	Z	P
Dawka (mg/szt.)	x	0,0002	0,002	0,002	0,02	0,02	0,2	0,2	2,0	2,0	PBS	PBS
Czas zamarcia (h)	x	-	48	-	48	-	48	-	48	48	-	-
Śmiertelność (%)	x	0	20	0	100	0	100	0	100	100	0	0
Masa ciała – pisklęta 7-dniowe (g)	x	50,8 ± 1,59	24,5 ± 1,38	48,8 ± 3,47	x	47,7 ± 3,21	x	51,4 ± 4,73	x	x	23,02 ± 4,2	47,8 ± 3,8
Długość skoku (mm)	x	x	2,05 ± 0,10	x	x	x	x	x	x	x	2,02 ± 3,2	x

Objaśnienia: jak w tab. 1.





Ryc. 1. Rozrost grudek chłonnych bursy Fabrycjusza – grupa I (barw. HE pow. 50 ×)

serwowano rozrost fałdów, któremu towarzyszył rozrost grudek chłonnych. W grupie III obok zmian proliferacyjnych pojawiły się również zmiany wsteczne. Zmiany te, to ogniskowa martwica centrów w bursie Fabrycjusza piskląt z grup IV i V (ryc. 2). W grupach tych obserwowano również nacieki heterofili w tkance śródmiąższowej oraz na obrzeżach grudek chłonnych. W grasicy, niezależnie od dawki chlorku litu, stwierdzano w różnym stopniu wyrażony ogniskowy zanik tymocytów w obrębie części korowej. W śledzionach piskląt z grup I, II i III dominował rozplam komórek siateczki, zaś w grupach IV i V – ogniskowy zanik tymocytów. W narządach mięsnych obserwowano przekrwienie, a w wątrobie ponadto zwyrodnienie tłuszczowe hepatocytów.

Jak wynika z przeglądu piśmiennictwa, więcej danych toksykologicznych zebrano na temat selenu. Ocenę wpływu jonów tego pierwiastka na przebieg embriogenezy zarodków kurzych podają, między innymi, Rzymowska i wsp. (16). Palmer i wsp. (14) porównując toksyczność dla 4-dniowych zarodków kurzych różnych związków chemicznych zawierających selen, zwracają uwagę na jego silne działanie embriotoksyczne. Autorzy ustalili, że dawka  $LD_{50}$  seleninu sodu dla zarodków wynosi 0,3 mg/kg. Wykazali oni również, iż formy selenu związane z aminokwasami siarkowymi są mniej toksyczne niż formy nieorganiczne tego pierwiastka.

Badania własne, których wyniki zebrano w tab. 2, potwierdzają również znaczną embriotoksyczność jonów selenu dla zarodków kurzych. Gdyby porównywać toksyczność tej samej dawki selenu dla zarodka i pisklęcia, to  $LD_{100}$  dla embrionów wynosi 0,02 mg, a dla jednodniowych piskląt 2,0 mg (czyli 100 razy więcej!). W grupie II (0,002 mg/zarodek) w czasie 48 h padło 20% zarodków, a przy dawce 10-krotnie wyższej (grupa III) padły wszystkie inokulowane embriony. W grupach piskląt: I, II, III i IV, którym podano odpowiednio 0,0002, 0,002, 0,02 i 0,2 mg preparatu/szt. nie stwierdzano zmian klinicznych ani padnięć. W grupie piskląt, które otrzymały 2 mg seleninu sodu padły



Ryc. 2. Ogniskowa martwica centrów grudek chłonnych bursy Fabrycjusza grupa V (barw. HE pow. 50 ×)

wszystkie ptaki. Przed zejściem obserwowano u nich senność, wielomocz, zaburzenia równowagi oraz pienisty wypływ z dzioba. Sekcyjnie u tych ptaków stwierdzono przekrwienie wątroby, nerek i błony śluzowej jelit.

W badaniu mikroskopowym wykazano przekrwienie trzustki, płuc, mięśni szkieletowych, a w wątrobie ponadto różnego stopnia zwyrodnienie tłuszczowe hepatocytów. Zmiany w wątrobie występowały u wszystkich sztuk niezależnie od dawki inokulum. Zmiany histopatologiczne w bursie Fabrycjusza wskazywały wyraźnie, że dawka 0,0002 seleninu sodu podana 1-dniowym pisklątom powoduje rozrost grudek chłonnych w tkance tego narządu. Przy dawce 0,02 mg (grupa III) obserwowano już zanik limfocytów oraz ogniskowy zanik centrów grudek chłonnych, któremu towarzyszył rozrost tkanki śródmiąższowej. Podobne, lecz znacznie silniej wyrażone zmiany notowano u piskląt z grup IV i V. Zmiany w grasicy u kurcząt z grup I i II miały charakter rozrzedzenia tymocytów kory tego narządu, natomiast w grupach IV i V stwierdzono wyraźny rozrost rdzenia. Zmiany w śledzionie u piskląt, które otrzymały selenin sodu dotyczyły rozplam komórek układu siateczki i zaniku limfocytów.

W przeprowadzonych badaniach głównym kryterium oceny toksyczności testowanych preparatów była śmiertelność piskląt i zarodków kurzych oraz charakter i nasilenie zmian patomorfologicznych w narządach wewnętrznych ptaków.

W literaturze nie znaleziono podobnej próby oceny właściwości toksycznych badanych preparatów dla ptaków. W niniejszych badaniach jony litu i selenu, jak również w poprzednich badaniach izoprinozyna i lewamizol podane pisklątom w najniższej koncentracji (I grupa ptaków) powodowały proliferację tkanki limfatycznej centralnych narządów układu odpornościowego – bursy Fabrycjusza i grasicy. Te immunostymulujące właściwości litu wcześniej już budziły duże zainteresowanie naukowców z dziedziny medycyny i weterynarii (5, 9, 15). U ludzi podjęto próby stosowania litu jako adiuwantu doustnego przy monitoro-

waniu odporności po podaniu szczepionek przeciwko różyczce i influencji (6), jak również jako stymulatora w profilaktyce nowotworów (2). O roli selenu w żywieniu ludzi i jego właściwościach terapeutycznych było głośno w latach 70. Jest to pierwiastek, który wchodzi m.in. w skład enzymów chroniących tkanki przed szkodliwymi następstwami działania wolnych rodników oraz odpowiedzialny jest za aktywację hormonu – tyroksyny (8). Synergistyczne działanie selenu z witaminą E stymuluje i chroni układ odpornościowy zarówno ludzi, jak i zwierząt (7, 8). Pod koniec lat 60. Thompson i Scott (23) wykazali, że selen w dawce pokarmowej ptaków jest niezbędnym składnikiem dla prawidłowego rozwoju i wzrostu kurcząt, ale wiadomo również, że przy wyższych dawkach pierwiastek ten posiada właściwości embriotoksyczne i teratogenne. Ta wysoka embriotoksyczność została potwierdzona badaniami własnymi, natomiast zwraca uwagę 100 × wyższa tolerancja tego pierwiastka przez pisklęta kurze i wyraźny jego wpływ stymulujący na grasicę, bursę Fabrycjusza i śledzionę.

Idealny preparat immunostymulujący dla praktyki drobiarskiej powinien być bezpieczny, skuteczny, rozpuszczalny w wodzie i tani (21). Wydaje się, że zarówno jony selenu, jak i jony litu mogą w dużym stopniu spełniać te wymogi. Jak wykazały wykonane badania, w niskich dawkach pierwiastki te powodują pobudzenie tkanki limfatycznej narządów układu odpornościowego piskląt. Wydaje się więc, że uzasadnione jest podjęcie dalszych badań nad określeniem nieszkodliwości i skuteczności tych pierwiastków dla kur w aspekcie ich ewentualnego wprowadzenia do praktyki weterynaryjnej jako modulatorów odporności.

## Piśmiennictwo

1. Büllow V. von, Schat K. A.: Infectious anemia. [w:] Diseases of Poultry. Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougall, Saif Y. M., Iowa Univ. Press, Iowa 1997, 739-756.
2. Cunningham R.: Infection prophylaxis for the patient with cancer. *Oncol. Nurs. Forum* 1990, 17, 16-19.
3. Garbaliński T.: Perspektywa profilaktyki immunohomeostatycznej. *Mat. VIII Kongres PTNW, cz. I* 1987, s. 12-15.
4. Garbaliński T.: Farmakologiczna osłona odporności przed agresją środowiskową. *Mat. II Symp. Nauk. z cyklu „Noworodek a środowisko”, Międzyzdroje* 1990, s. 7-19.
5. Hoshi S., Uchino A., Saito N., Kusanagi K. I., Ihara T., Ueda S.: Comparison of adjuvants with respect to serum IgG antibody response in orally immunized chickens. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 1999, 22, 63-69.
6. Ishizaka S., Yoshikawa M., Kitagami K., Tsujii T.: Oral adjuvants for viral vaccines in humans. *Vaccine* 1990, 8, 337-341.
7. Fox J. M.: Selenium: Nutritional implications and prospects for therapeutic medicine. *Meth. Find Exp. Clin. Pharmacol.* 1992, 14, 275-287.
8. Klasing K. C.: Interactions between nutrition and infectious disease. „Diseases of Poultry” Calnek B. W., Barnes H. J., Beard C. W., McDougall, Saif Y. M., Iowa Univ. Press, Iowa 1997, 26-28.
9. Kluciński W., Miernik E., Szeleszczuk B., Zaleska M.: Wpływ in vitro jonów litu na stymulację limfocytów T krwi i mleka u krów. *Medycyna Wet.* 1986, 42, 79-81.
10. Lütticken D.: Viral diseases of the immune system and strategies to control infectious bursal disease by vaccination. *Acta Vet. Hung.* 1997, 45, 239-249.
11. Markowska-Daniel I.: Stymulacja odpowiedzi immunologicznej przy pomocy naturalnych i chemicznych immunomodulatorów w terapii i profilaktyce. *Medycyna Wet.* 1991, 47, 306-310.

12. Minta Z.: Przyczyny immunosupresji u drobiu. *Mat. Konf. Nauk. Wrocław* 1990, 24-25.
13. Nelson R. P. Jr., Ballou M.: Immunomodulation and immunotherapy: Drugs, cytokine, cytokine receptors, and antibodies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2003, 111, 720-743.
14. Palmer I. S., Arnold R. L., Carlson C. W.: Toxicity of various selenium derivatives to chick embryos. *Poultry Sci.* 1973, 52, 1841-1846.
15. Roliński Z.: Badania nad zwiększeniem skuteczności działania chemioterapeutyków w infekcjach przewodu pokarmowego u cieląt i prosiąt. *Nauka praktyce – MEN*. Lublin 1990, 73-75.
16. Rzymowska J., Paździor M., Górski M.: Wpływ selenu na embriogenezę kurcząt. *Ann. Univ. Mariae Curie-Skłodowska, sectio C* 1985, 40, 37-42.
17. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrun W., Wilczyńska-Kowal M.: Wpływ immunostymulatorów na serokonwersję po szczepieniu przeciwko chorobie Derzsy'ego u gęsi. *Medycyna Wet.* 2000, 56, 103-106.
18. Samorek-Salamonowicz E., Czekaj H., Kozdrun W.: Czynniki wpływające na skuteczność szczepień przeciwko chorobie Mareka. *Mat. Konf. Nauk. Choroba Mareka, Puławy* 2001, s. 38-44.
19. Sharma J. M., Kim I. J., Rautenschlein S., Yeh H.: Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. *Dev. Comp. Immunol.* 2000, 24, 223-235.
20. Sharma J. M., Karaca K., Pertile T.: Virus-induced immunosuppression in chickens. *Poultry Sci.* 1994, 73, 1082-1086.
21. Szeleszczuk P.: Perspektywy immunostymulacji farmakologicznej w drobiarstwie. *Mat. Konf. Nauk. Aktualne problemy w patologii drobiu*. Wrocław 1991, s. 34.
22. Szeleszczuk P., Karpińska E., Bielecki W., Borzemska W., Kosowska G.: Evaluation of chosen immunomodulators toxicity for chicken embryos and one-day-old chicks. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2003, w druku.
23. Thompson J. N., Scott M. L.: Role of selenium in nutrition of the chick. *J. Nutr.* 1969, 97, 335-342.
24. van Veen L.: Immunosuppression in chickens. *Tijdschr. Diergeneesk.* 2001, 126, 10-11.

Adres autora: dr hab. Piotr Szeleszczuk, ul. Miklaszewskiego 4/25, 02-776 Warszawa

## WARUIRU R. M.: Skuteczność klozantelu w kombinacji z albendazolem w naturalnym i doświadczalnym zarażeniu kóz nicieniami. (Efficacy of clozantel plus albendazole combination against naturally acquired and experimentally induced nematode infections in goats). *Israel J. Vet. Med.* 57, 113-117, 23002 (3)

Badania przeprowadzono na 60 kozach zarażonych na drodze naturalnej nicieniami żołądkowo-jelitowymi w 3 grupach doświadczalnych. Grupa I nieleczone stanowiła kontrolę, w grupie II zastosowano jednorazowo albendazol (ABZ) w dawce 5 mg/kg, w grupie III ABZ w dawce 5 mg/kg łącznie z klozantelem (CLS) w dawce 10 mg/kg. Liczbę wydalanych z kałem jaj i larw III stopnia określano w odstępach tygodniowych przez okres 7 tygodni po leczeniu. W drugim eksperymencie przeprowadzonym na 21 kozach zarażonych eksperymentalnie larwami III stopnia opornymi na ABZ w trzech grupach doświadczalnych zastosowano ABZ w dawce 5 mg/kg, CLS w dawce 10 mg/kg. Po 10 dniach zwierzęta zabito i określono liczbę pasożytów w przewodzie pokarmowym. Jedną dawkę CLS+ABZ lub samego ABZ hamowała w 100% wydalanie jaj z kałem 2. tygodnia po leczeniu. Łączne stosowanie CLZ z ABZ cechowała 99-100% skuteczność w stosunku do *Haemonchus contortus*, *Trichostrongylus axei*, *T. colubriformis*, *Cooperia curticei* i *Oesophagostomum columbianum*. Skuteczność ABZ w stosunku do *H. contortus* wynosiła 29%, a do pozostałych pasożytów 100%. Najlepsze efekty w przypadku *H. contortus* opornego na ABZ uzyskano stosując łącznie CLS i ABZ.