

SBORNÍK
ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Veterinární medicína

9 ✓

ROČNÍK 6 (XXXIV) – PRAHA, ZÁŘÍ 1961

CENA 10 Kčs

SBORNÍK

Československé akademie zemědělských věd

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Rídí redakční rada: akademik Vincenc Jelínek (předseda), gen. MVDr. Vladimír Chládek, člen korespondent SAV František Nižnánský, MVDr. Jiří Boháč, prof. MVDr. Richard Harnach, doc. MVDr. Jaroslav Dražan, prof. MVDr. Karel Šobra, prof. MVDr. Emanuel Král, MVDr. Ladislav Zima, MVDr. Ladislav Polák, MVDr. František Lehký, doc. MVDr. inž. Jan Vlček. Vedoucí redaktor František Němec.

© Československá akademie zemědělských věd, Praha 1961

Obsah — Содержание — Content — Inhalt

- Neuman V., Maděrová V.: Dynamika změn aktivity sérové GOT a GPT koní po aplikaci CCl₄ s přihlédnutím k celkovému bilirubinu a cholesterolu a ve vztahu ke klinickému průběhu onemocnění a k morfologickým změnám jaterní tkáně
Динамика изменений активности сывороточной GOT и GPT после применения CCl₄ с учетом клинического течения болезни и морфологических изменений печеночной ткани
Die Dynamik der Aktivitätsänderungen der Serum-GOT und -GPT nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff mit Berücksichtigung des Gesamtbilirubins und -Cholesterols und in Beziehung zum klinischen Verlauf der Erkrankung und zu den morphologischen Veränderungen des Lebergewebes 691
- Mandel L., Trávníček J., Šimek L.: Krevní obraz časně odstavených selat, odchovávaných s použitím chloramfenikolu
Картина крови рано отнятых поросят, выращиваемых с применением хлорамфеникола (синтомицина)
The Blood Picture in Early Weaned Piglets Reared Using Chloramphenicol 705
- Skalka B.: Stabilizace L-form Erysipelothrix rhusiopathiae
Стабилизация Л-форм Erysipelothrix rhusiopathiae
Stabilization of L-forms of Erysipelothrix rhusiopathiae 715
- Lehký F.: Hodnoty nativního komplementu v krevním séru klinicky zdravých psů
Величины природного комплемента в кровяной сыворотке клинически здоровых собак
The Value of Native Complement in the Blood Serum of Clinically healthy Dogs 721

Dynamika změn aktivity sérové GOT a GPT koní po aplikaci CCl₄ s přihlédnutím k celkovému bilirubinu a cholesterolu a ve vztahu ke klinickému průběhu onemocnění a k morfologickým změnám jaterní tkáně

Динамика изменений активности сывороточной GOT и GPT после применения CCl₄
с учетом клинического течения болезни и морфологических изменений
печеночной ткани

Die Dynamik der Aktivitätsänderungen der Serum-GOT und -GPT nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff mit Berücksichtigung des Gesamtbilirubins und -Cholesterols und in Beziehung zum klinischen Verlauf der Erkrankung und zu den morphologischen Veränderungen des Lebergewebes

Doc. MVDr Vojtěch NEUMAN — PhMr Vlasta MADEROVÁ
Z katedry lékařské chemie, fyziky a toxikologie veterinární fakulty VŠZ v Brně,
vedoucí katedry prof. MVDr A. Janeček,

MVDr Stanislav HUSÁK
Z I. interní kliniky veterinární fakulty VŠZ v Brně,
přednosta prof. MVDr Karel Šobra.

Došlo dne 1. II. 1961

Úvod

Tato práce navazuje na dřívější sdělení Neumana a Maděrové o aktivitě transamináz GOT a GPT krevního séra koní a skotu (1—4) a o průběhu změn jejich aktivity v séru morčat s experimentální toxickou hepatitidou ve vztahu k morfologickým změnám jaterní tkáně (5). Z poslední práce vyplynulo, že po akutním poškození jater se zvyšuje aktivita obou sérových transamináz v těsné korelaci s rozvojem nekrobiotických pochodů, ale jen³ dotud, pokud se v játrech zároveň zřetelněji neprojevují reaktivní pochody; potom se začíná postupně snižovat k normě. Pokusná morčata byla sledována pouze čtyři dny. V tomto krátkodobém pokuse nebylo proto možné s jistotou rozhodnout, zda uvedené snižování aktivity je pouze důsledkem eliminace, případně inaktivace enzymů, nebo zda je také v souladu s intenzitou reaktivních a regeneračních pochodů. Ve snaze přispět k objasnění této otázky, je v této práci sledována dynamika změn aktivity sérových transamináz u koní po aplikaci CCl₄ v průběhu delšího časového rozmezí.

Přehled literatury

Souborný přehled literatury o významu a diagnostické hodnotě stanovení aktivity sérových transamináz v klinické praxi humánní a veterinární byl podán v předchozích pracích Neumana a Maděrové (1–5). Omezíme se proto pouze na údaje, týkající se transaminázové aktivity séra jednak zdravých koní, jednak koní se spontánním nebo experimentálním poškozením jater.

Hodnoty GOT a GPT krevního séra zdravých koní udávané různými autory jsou uvedeny v tab. I. Většina údajů se navzájem dobře shoduje. Poněkud vyšší hodnoty GOT a GPT zjistili Gürtler a Richter (10), a pro GPT také Cornelius a spol. (6); naopak nižší hodnoty GOT udává Šlesinger s Továrkem (7) a velmi nízkou aktivitu GOT v séru zdravých koní zjistil Konrád (11).

I. Aktivita GOT a GPT krevního séra zdravých koní

Autor	GOT		GPT	
	μM / 1 ml séra μg / 1 ml séra kyseliny pyrohroznové	Frankelovy j. Karmenovy j.	μM / 1 ml séra μg / 1 ml séra kyseliny pyrohroznové	Frankelovy j. Karmenovy j.
Cornelius a spol. (6)	$158 \pm 37,4 \mu\text{g}$	$165 \pm 33,8 \text{ F. j.}$	$8,0 \pm 5,9 \mu\text{g}$	$11,0 \pm 3,8 \text{ F. j.}$
Šlesinger Továrek (7)	$3,03 \mu\text{M}$	—	$0,14 \mu\text{M}$	—
Horák, Jicha, Sova (8)	—	$210,0 \text{ K. j.}$ (143 – 268)	—	$6,34 \text{ K. j.}$ (0,7 – 14,9)
Neuman, Ma- děrová (1, 2)	$8,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$	$176 \pm 36 \text{ K. j.}$ (100 – 260)	$0,22 \pm 0,05 \mu\text{M}$	$5,25 \pm 1,28 \text{ K. j.}$ (3,0 – 7,25)
Hudeček (9)	—	$140 - 290 \text{ K. j.}$	—	$5 - 25 \text{ K. j.}$
Gürtler, Richter (10)	—	$260 \pm 42,8 \text{ K. j.}$ (163 – 367)	—	$9 \pm 5,9 \text{ K. j.}$ (0 – 20)
Konrád (11)	—	$59,3 \text{ K. j.}$ (50 – 80)	—	$4,9 \text{ K. j.}$ (2 – 10)

U koní s onemocněním jater, a to ve všech případech kdy byla prokázána nekróza jaterní tkáně, zjistili S o v a a spol. (12) $445 - 700 \text{ K. j. GOT}$; u týchž koní byla GPT zvýšena pouze v 80 % případů a pohybovala se v rozmezí 3,9 až 35,8 K. j. Aktivitu sérové GOT při Žďárské chorobě koní udává H u d e č e k (9) hodnotami 210–810 K. j. a aktivitu GPT 8–48 K. j. Velmi nízkou aktivitu, zejména GOT při akutních procesech jaterních zaznamenal Konrád (11). Pro GOT udává v průměru 94 K. j., pro GPT 23,8 K. j.; při hypertrofických cirhózách u Žďárské choroby koní nezjistil prakticky zvýšenou transaminázovou aktivitu séra.

Velmi významně zvýšené množství sérové GOT zjistili v orientačním pokuse Cornelius a spol. (6) a Šlesinger (13) u koní po podání chloridu uhličitého; akti-

vita GPT byla v těchto pokusech zvýšena naproti tomu jen zcela nepatrně.

Dynamika změn aktivity obou sérových transamináz byla dosud studována jen velmi nedostatečně. Tak např. Cornelius a spol. (6) sledovali průběh aktivity GOT a GPT u dvou koní po podání CCl_4 pouze po dobu čtyř dnů. Takové krátkodobé pozorování neskýtá přesný obraz o vztahu mezi transaminázovou aktivitou séra na jedné straně a průběhem onemocnění, případně také morfologickými změnami jaterní tkáně na straně druhé. Rozšíření našich poznatků o tyto vztahy a jejich bližší objasnění je hlavním úkolem předložené práce.

Materiál a metodika

Toxická hepatitida, vyvolaná jednorázovou aplikací chloridu uhličitého, byla modelem akutního poškození jater s degenerativně — nekrobiotickými pochody. K pokusu bylo použito 6 koní (viz tab. II), kterým bylo podáno perorálně sondou celkem 55–150 ml CCl_4 , tj. 0,1–0,27 ml chloridu uhličitého na 1 kg ž. v. Chlorid uhličitý byl podáván ve směsi se třemi litry vody, 4 hodiny po ranním krmení. Zdravotní stav zvířat byl klinicky vyšetřen před pokusem a pak sledován v průběhu 4 týdnů po aplikaci látky. Stav jater byl kontrolován histologickým vyšetřením jejich tkáně, získané biopsií, která byla provedena před pokusem a pak za 3, 7, 19, 25 a 30 dní po aplikaci látky. U všech pokusných zvířat byla běžným způsobem analyzována moč, vyšetřen krevní obraz, sedimentace krve a stanoveno množství hemoglobinu. Krev byla odebrána punkcí *v. jugularis*, a to vždy v ranních hodinách. V krevním séru bylo pak určováno množství transaminázy kyseliny glutamové-oxalocitové (GOT) a kyseliny glutamové-pyrohroznové (GPT), hladina celkového bilirubinu a cholesterolu, a to jednak před pokusem, jednak v určitých časových intervalech (viz tab. III) po aplikaci CCl_4 .

II. Údaje o pokusných koních

Poř. číslo	Číslo protokolu	Pohlaví, stáří	Váha	Dávka CCl_4	Výsledky klinického vyšetření před pokusem
1.	591/59	klisna, ryzák, 21 r.	540 kg	55 ml	<i>Bronchitis chronica, Emphysema alv. chron.</i>
2.	592/59	valach, tmavý ryzák, 12 r.	600 kg	100 ml	negat.
3.	503/59	klisna, hnědák, 8 r.	560 kg	100 ml	<i>Bronchitis chronica</i>
4.	590/59	valach, hnědák, 18 r.	620 kg	150 ml	negat.
5.	329/59	klisna, ryzák, 3 r.	560 kg	150 ml	Atrofie levého očního bulbu po iridocyklochorioiditidě, mírná ataxie zadních končetin
6.	370	klisna, ryzák, 1,5 r.	370 kg	100 ml	Jizva v krajině parotideaální, mírně zvětšené mízní uzliny podčelistní po hříběci

Sérové transaminázy byly určovány metodou podle Reitmanna a Frankela (15), upravenou Maděrovou a Neumanem (1, 2) pro analýzu sér koní. Celkový bilirubin byl stanoven podle Jendrassika a Grófa (16) v úpravě Bergerově (17), hladina celkového cholesterolu metodou popsanou Pearsonem a spol. (18), kterou u hospodářských zvířat použila Maděrová (19).

Výsledky byly statisticky zpracovány a vyhodnoceny Studentovým t-testem (20). Těsnost vztahů mezi aktivitou sérové GOT na jedné straně a hladinou celkového bilirubinu a cholesterolu na straně druhé je vyjádřena korelačním koeficientem r a mírou těsnosti B (Bestimmtheitsmaß). Výpočty byly provedeny podle Weberové (21).

V ý s l e d k y

Před aplikací chloridu uhličitého byl klinický nález u dvou koní (č. 2 a 4) zcela negativní, u dvou koní (č. 1 a 3) byla zjištěna chronická bronchitida, u koně č. 5 atrofie levého očního bulbu po překonané iridocyklochoriotidě a mírná ataxie zadních končetin a u koně č. 6 jizva v krajině parotideální a mírně zvětšená mízní uzlina podčelistní po hříběcí. Histologickým vyšetřením jaterních punktátů byla pouze u jednoho koně zjištěna sektorová kolagenizace retikulinové kostry bez porušení pravidelné struktury, játra ostatních koní byla bez patologicko-histologického nálezu.

Po aplikaci CCl_4 byla u všech koní pozorována snížená chuť až nechutenství, trvající 2–3 dny, u koně č. 2 až týden. Ve stejnou dobu měl vydechovaný vzduch nasládlý zápach a spojivky byly zarudlé, u dvou koní (č. 3 a 4) s ikterickým nádechem, který rovněž vymizel během týdne. Teplota převážné většiny koní vykazovala mírný vzestup v prvních třech dnech po aplikaci látky. Nejvyšší teplota $39,5^\circ\text{C}$ byla zjištěna u koně č. 5. Druhý den po provedené biopsii byl často zjišťován podkožní emfyzém v rozsahu 10–20 cm kolem místa vpichu, který zpravidla vymizel do jednoho týdne. Po druhé biopsii kůň č. 6 ulehl a zůstal klidně ležet 3 hodiny, v dalším průběhu pokusu se choval normálně.

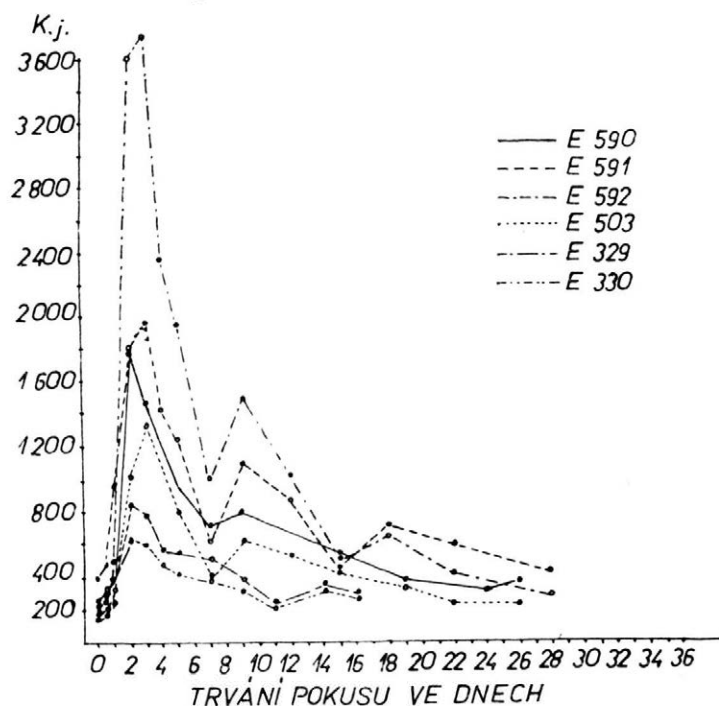
Po podání chloridu uhličitého nebyl významněji ovlivněn ani krevní obraz, ani množství hemoglobinu a sedimentace krve pokusných zvířat. V moči pokus-

III. Průměrná aktivita GOT, GPT, hladina bilirubinu a cholesterolu v krevním séru pokusných koní po aplikaci CCl_4

Trvání pokusu ve dnech	GOT	GPT	Bilirubin	Cholesterol
	v K. j.		v mg%	
Před pokusem	236 ± 35	6,1 ± 0,98	1,12 ± 0,66	122,4 ± 7,07
1/2	291 ± 46	6,1 ± 0,99	1,75 ± 0,32	117,0 ± 5,16
1	465 ± 103	6,3 ± 1,51	1,93 ± 0,33	107,1 ± 5,33
2	1630 ± 450	7,0 ± 0,96	2,20 ± 0,41	91,8 ± 7,80
3	1656 ± 473	7,0 ± 0,91	2,47 ± 0,44	88,0 ± 8,27
5	990 ± 224	6,2 ± 0,71	2,15 ± 0,38	96,5 ± 8,92
7	608 ± 93	6,0 ± 0,70	1,93 ± 0,37	106,1 ± 9,90
9	788 ± 183	6,2 ± 0,75	1,80 ± 0,28	107,0 ± 5,58
11–12	594 ± 133	6,0 ± 0,75	1,74 ± 0,32	112,1 ± 6,52
14–15	442 ± 37	5,6 ± 0,63	1,76 ± 0,27	109,1 ± 6,15
18–19	447 ± 78	5,8 ± 0,82	1,46 ± 0,34	107,5 ± 5,89
22–24	392 ± 79	6,1 ± 1,17	1,87 ± 0,28	107,2 ± 9,12
26–28	333 ± 43	6,2 ± 1,19	1,92 ± 0,29	111,5 ± 9,43

ných koní jsme nacházeli žlučová barviva v různém množství převážně po dobu jednoho týdne po aplikaci CCl_4 . Sediment močový se skládal vesměs z uhličitanu vápenatého a jeho množství nepravidelně kolísalo. Buněčné elementy (bílé krvinky, epitelie ledvin) byly zjištěny v moči pouze u koně č. 3; malé množství bílkovin bylo prokázáno u dvou koní (č. 2 a 4) třetí den po podání CCl_4 a u koně č. 3 po třetí biopsii jaterní. Cukr se objevil v moči pouze u koně č. 1, a to třetí a třicátýtřetí den pokusu.

Průměrná aktivita GOT a GPT, hladina celkového bilirubinu a cholesterolu krevního séra pokusných koní v různých časových intervalech po podání chloridu uhličitého je uvedena v přehledné tab. III. Dynamika změn aktivity sérové GOT a GPT je znázorněna na grafu 1 a 2.

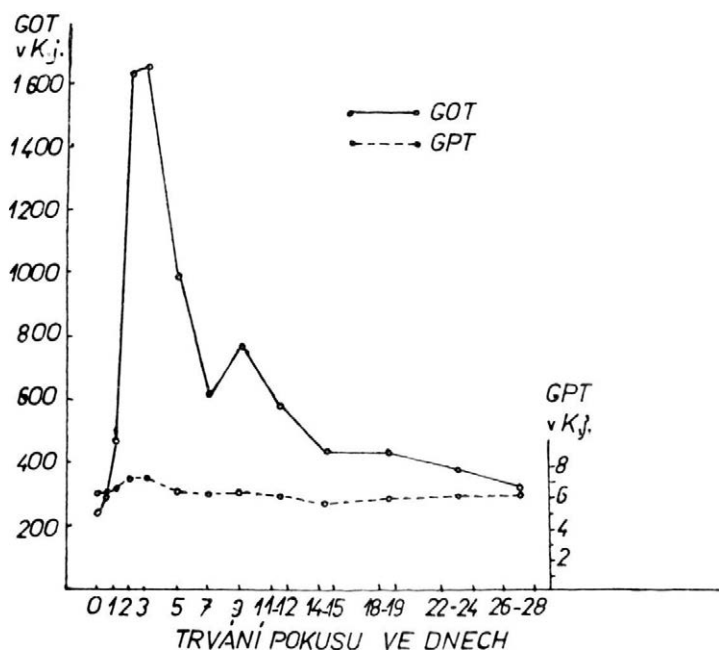


Graf 1. Průběh změn aktivit GOT jednotlivých koní po aplikaci CCl_4

Nepatrné zvýšení sérové GOT bylo zjištěno již za 12–24 hod. po aplikaci CCl_4 . Hodnota zaznamenaná za 24 hod. po podání látky je na hranici statistické významnosti. Nejvyšší aktivitu GOT měla séra pokusných koní za 48–72 hod. po podání chloridu uhličitého. V tomto časovém rozmezí činila v průměru 1630 ± 450 a 1656 ± 473 K. j. a proti průměrné hodnotě sérové GOT před pokusem byla zvýšena 6–7krát. V dalším průběhu prudce klesala a sedmý den po aplikaci látky byla zvýšena již jen 2,5krát. Po přechodném malém zvýšení, zaznamenaném 9. den pokusu zvolna klesala k hodnotě, zjištěné před pokusem. Statisticky významné zvýšení aktivity GOT bylo zjištěno ještě mezi 14. až 15. dnem pokusu ($P < 0,01$). Mezi 18.–19. dnem bylo zvýšení aktivity na hranici statistické významnosti ($P < 0,1$ a $> 0,05$). Při ukončení pokusu, mezi 26.–28. dnem po podání CCl_4 byla aktivita sérové GOT zvýšena již jen o 41 %. Toto zvýšení není již statisticky významné ($P > 0,2$).

Aktivita sérové GPT měla mírně stoupající tendenci do třetího dne po podání chloridu uhličitého. Avšak i v tomto časovém intervalu byla proti její aktivitě před pokusem zvýšena jen o 16 %, tedy statisticky nevýznamně. V dalším průběhu pak klesla a až do ukončení pokusu se udržovala na hodnotě velmi blízké její aktivitě před pokusem.

Hladina celkového bilirubinu v séru pokusných koní se po aplikaci chloridu uhličitého rovněž postupně zvyšovala. Nejvyšší hladina byla zjištěna v časovém úseku 3 dnů po aplikaci látky, načež pak začala klesat. Počínaje druhým dnem až do pátého dne bylo zvýšení statisticky významné ($P < 0,05$) a hodnota, zaznamenaná 1. a 7. den po podání látky byla na hranici statistické významnosti ($P < 0,1$ a $P > 0,05$). V dalším průběhu pokusu zůstávala hladina bilirubinu až na menší výkyvy prakticky na stejné úrovni.



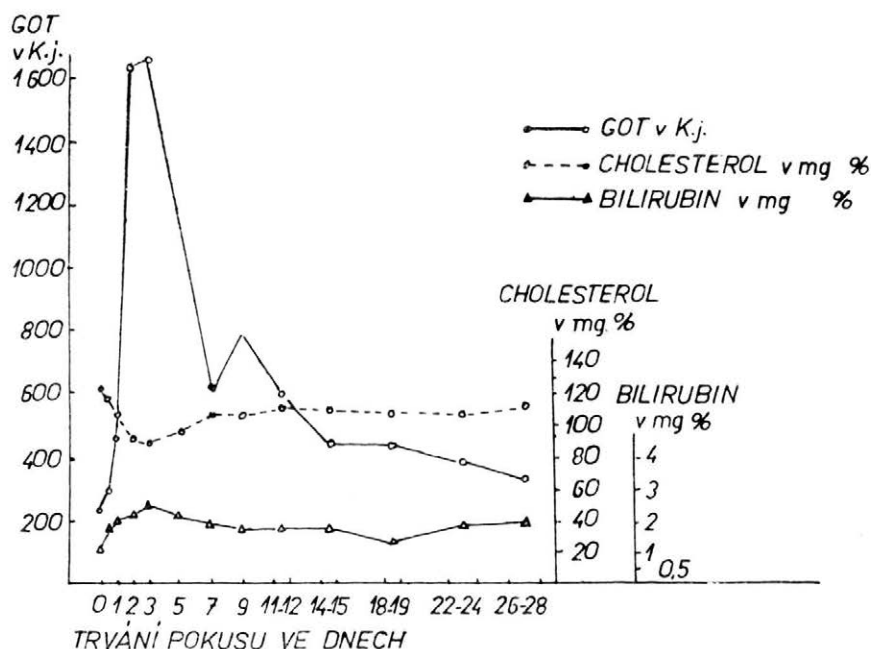
Graf 2. Průběh změn aktivity sérové GOT a GPT pokusných koní po aplikaci CCl_4

Vcelku velmi podobný avšak protikladný průběh proti změnám celkového bilirubinu měly změny hladiny celkového cholesterolu v séru pokusných zvířat. Již krátce po podání CCl_4 měla hladina celkového cholesterolu klesající tendenci. Nejnižší hodnota, která je o 28 % nižší než hladina cholesterolu před pokusem, byla zjištěna třetí den po aplikaci látky. Statisticky významné snížení bylo zaznamenáno od druhého do pátého dne ($P < 0,05$). V dalším průběhu se pak poněkud zvýšila a od 7. dne až do skončení pokusu se udržovala prakticky na stejné výši.

Dynamika změn celkového bilirubinu a cholesterolu v séru pokusných koní je znázorněna na gr. 3, na němž je pro porovnání vyznačen také průběh změn aktivity sérové GOT.

Uvedeným nálezům klinickým a výsledkům biochemických analýz odpovídaly také histologické změny jaterních punktátů. Nejvýznamnější nálezy byly za-

znamenány u punktátů, získaných třetí den po podání CCl_4 . Ve všech případech byla zjištěna centroacinosní nekrobióza jaterních buněk. Její rozsah byl různý. Zůstala buď omezena jen na úzký pruh v okolí centrálních žil a byla ostře oddělena od zdravé tkáně, kde jen místy docházelo k nekróze jednotlivých jaterních buněk, nebo zasahovala do různé hloubky acinů a v některých místech vystřelovala až k periférii. V druhém případě nekrobiotická ložiska sousedních acinů místy pruhovitě splývala. V zóně nekrobiózy byly jaterní buňky zaoblené, vakuolizované a místy docházelo k výrazné cytolýze. Jádra buněk byla pyknotická, zmenšená, přecházející v pouhé stíny, nebo zcela se rozpadla v chromatinové hrudky. V těchto případech zůstala pak zachována pouze retikulární a vaskulární kostra s buněčným detritem, četnými oxyfilními hyalinními koulemi a hrudkami



Graf 3. Dynamika změn aktivity GOT, hladiny cholesterolu a bilirubinu v séru koní po aplikaci CCl_4

jaderného chromatinu. V nekrobiotických okrcích byla zjišťována aktivace mesenchymálních buněk a ojedinělé eosinofilní a neutrofilní granulocyty. V degenerovaných jaterních buňkách byl nalézán zrnitý hnědý pigment.

V jaterních punktátech, získaných 7. den po podání CCl_4 byla v centrech acinů ještě výrazná destrukce jaterních buněk s ojedinělými eosinofily. Na periférii nekrosů byly příznaky reparace.

Ve vzorcích jaterní tkáně, získaných v dalším průběhu pokusu vystupovaly do popředí stále zřetelněji regenerační pochody. Za 19 dní po aplikaci látky bylo místo léze téměř zcela zaplněno jaterními buňkami nestejně velikosti, které však byly ještě neuspořádané a některé z nich byly vakuolizované. Poškození struktury bylo dosud výrazné a zároveň byla patrna kolagenizace retikulinové kostry.

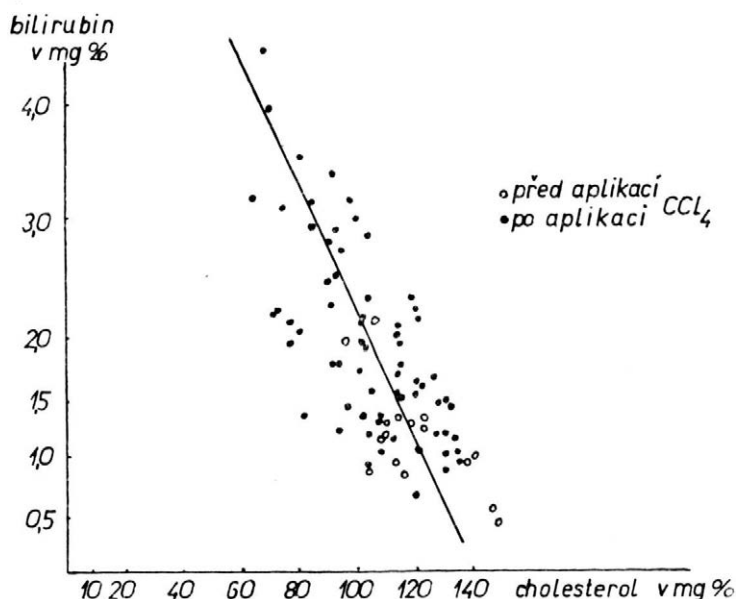
V punktátech, odebraných za 25 a 30 dní po aplikaci látky byla místa léze (centra acinů) dobře vyplněna jaterními buňkami různé velikosti. Buňky byly řidčeji a poněkud neuspořádaně uloženy. Ojediněle se vyskytly eosinofily. Stěny

centrálních žil byly zduřelé a hyalinizované. V místech bývalé léze bylo patrné zhrubnutí a kolagenizace retikulinové kostry. Ve všech případech nastala již téměř dokonalá regenerace.

Diskuse

Nejvyšší aktivita sérové GOT a GPT pokusných koní byla zjištěna za 48 až 72 hod. po podání CCl_4 . V této době byla aktivita GOT zvýšena 6–7krát, aktivita GPT však pouze o 16 % proti její hodnotě, zjištěné před pokusem.

Dynamika změn aktivity sérových transamináz u pokusných koní měla tedy odlišný průběh, než jaký byl zjištěn u lidí s akutní hepatitidou a u morčat po aplikaci CCl_4 . Při akutním poškození jater lidí je sice zvýšena hladina obou trans-



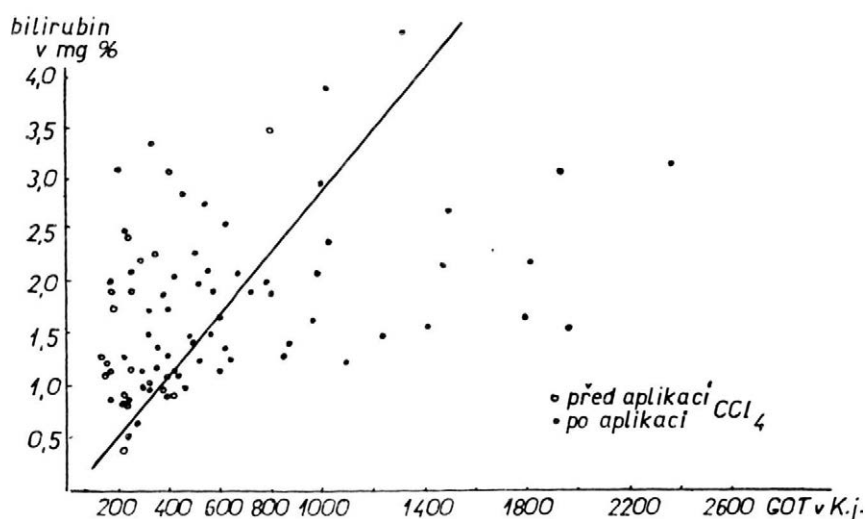
Graf 4. Regresní přímka pro vztah mezi hladinou celkového cholesterolu a celkového bilirubinu v séru koní po podání CCl_4 ($r = 0,760$, $B = 0,57$).

amináz, ale k zřetelnějšímu vzestupu obvykle dochází u GPT. Poměr aktivit S-GOT ku S-GPT, který je u zdravých lidí 1,23, klesá proto u jedinců s virovou hepatitidou na průměrnou hodnotu 0,65 (22, 23). U morčat se po jednorázové podkožní aplikaci CCl_4 podstatněji zvýšila aktivita S-GOT, avšak velmi výrazné bylo také zvýšení S-GPT (5).

Výsledky této práce ukazují, že u koní po aplikaci CCl_4 se zvýšilo především množství S-GOT, kdežto vzestup aktivity S-GPT byl naproti tomu jen velmi nepatrný a statisticky nevýznamný. Tento závěr souhlasí s výsledky experimentálního pozorování Corneliuse a spol. (6), Šlesingra a Továrka (7) a také s údaji Sovy a spol. (12) a Hudečka (9), které byly získány analýzou sér klinických pacientů s poškozenými játry. Tento jev zřejmě souvisí s tím, že játra koní obsahují asi 60krát více GOT než GPT. Podle Corneliuse a spol. (6) činí totiž aktivita GOT v játrech koní $630 \mu\text{g}$, kdežto GPT pouze $11,7 \mu\text{g}$ pyrohroznanu/20 min./ 25°C /1 mg sušiny jater. V rozporu s dosaženými výsledky je pouze údaj

Konrádův (11), který při akutních procesech jaterních zjistil velmi nízkou hodnotu GOT (v průměru 96 K. j.), která představuje jen nepatrné zvýšení transaminázové aktivity séra (v průměru asi o 56 %), proti hodnotě, kterou zaznamenal u kontrolních zvířat. U těchto koní byla GPT naproti tomu zvýšena zhruba asi pětkrát.

Porovnáme-li průběh jednotlivých křivek na grafu 3 vidíme, že hodnoty GOT, bilirubinu a cholesterolu v séru pokusných koní se navzájem doplňují a to zejména v prvních pěti až sedmi dnech po podání látky. V tomto časovém úseku souběžně se zvýšenou aktivitou sérové GOT byla zaznamenána také zvýšená hladina celkového bilirubinu a pokles hladiny celkového cholesterolu. Zvýšení hladiny bilirubinu a pokles hladiny cholesterolu byly totiž statisticky významné pouze od druhého do pátého dne po aplikaci látky. Hodnoty těchto ukazatelů, zaznamenané 1. a 7. den pokusu, byly jen na hranici statistické významnosti. Aktivita GOT byla naproti tomu signifikantně zvýšena ještě i mezi 14. – 15. dnem pokusu.



Graf 5. Regresní přímka pro vztah mezi aktivitou GOT a hladinou celkového bilirubinu v séru koní po aplikaci CCl_4 ($r = 0,429$, $B = 0,18$).

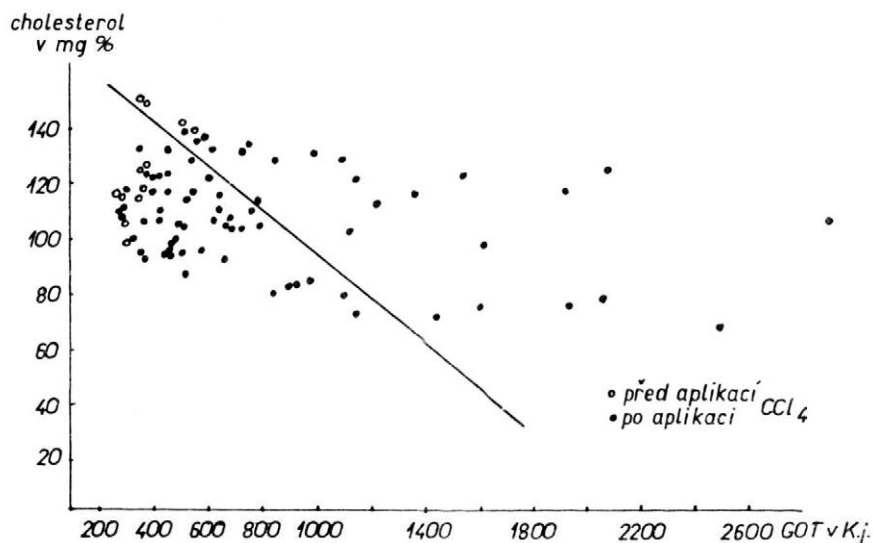
Vztah mezi hladinou celkového cholesterolu a hladinou celkového bilirubinu je znázorněn regresní přímkou na gr. 4. Korelace mezi uvedenými hodnotami je velmi těsná a statisticky významná. Korelační koeficient r se rovná 0,760, hodnota B (Bestimmtheitsmaß) 0,57, což znamená, že 57 % rozptylu se dá vyjádřit lineární závislostí.

Volnější je vztah mezi aktivitou GOT a hladinou celkového bilirubinu ($r = 0,429$, $B = 0,18$). Zcela bezvýznamná je korelace mezi aktivitou GOT a hladinou celkového cholesterolu ($r = 0,112$, $B = 0,012$). Nízké korelační koeficienty v posledních dvou případech jsou způsobeny tím, že zejména extrémně vysokým hodnotám GOT neodpovídá zvýšení hladiny bilirubinu, nebo snížení hladiny cholesterolu v séru.

Vzestup aktivity sérové GOT, zvýšení hladiny celkového bilirubinu a snížení cholesterolu, které byly zaznamenány v prvních třech dnech s maximem mezi 2. – 3. dnem po podání látky, jsou v dobré korelaci s klinickým průběhem onemocnění a s rozvojem nekrobiotických změn jaterní tkáně. I když celkový obraz

toxikózy nebyl klinicky nijak zvlášť výrazný, byly její symptómy (nechutenství, zarudnutí spojivek, mírný vzestup teploty) nejvíce vyjádřeny právě v uvedeném časovém rozmezí.

Morfologické změny (centroacínózní nekrobióza) byly rovněž nejvýznačnější v jaterních punktátech, získaných za 3 dny po podání látky. Ve vzorcích odebraných 7. den po aplikaci chloridu uhličitého, byly již vyznačeny příznaky reparace. V tomto stadiu histologických změn jaterní tkáň bylo zvýšení bilirubinu a snížení cholesterolu již jen na hranici statistické významnosti, aktivita GOT byla naproti tomu stále ještě velmi významně zvýšena, a to až do 14. — 15. dne po podání látky. Dokonce i 18. — 19. den, kdy v histologickém obrazu bylo ještě výrazné poškození struktury jaterní tkáň, bylo zvýšení aktivity sérové GOT na hranici statistické významnosti. V dalším stadiu (za 25 a 30 dní po podání chloridu uhličitého), v němž jaterní tkáň byla již téměř dokonale regenerována, bylo zvýšení GOT vcelku malé a statisticky nevýznamné.

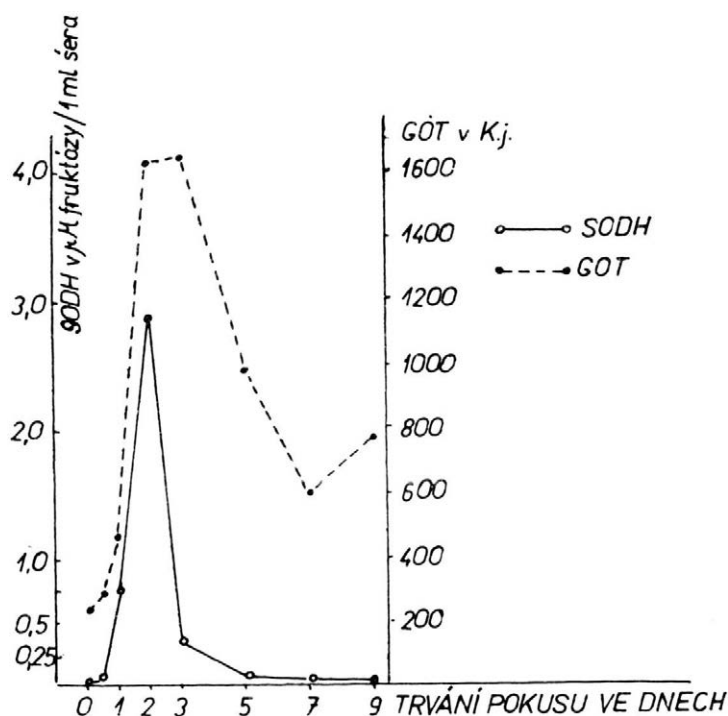


Graf 6. Regresní přímka pro vztah mezi aktivitou GOT a hladinou celkového cholesterolu v séru koní po podání CCl_4 ($r = 0,112$, $B = 0,012$)

Dosažené výsledky vhodně doplňují údaje, uvedené v práci Neumana, Maděrové a Zendulky (5) a poukazují na to, že vzestup aktivity GOT je v těsné korelaci se vznikem nekrobiotického pochodu v játrech. Následující její postupné snižování spolu s poklesem hladiny bilirubinu a vzestupem celkového cholesterolu je pak v souladu s rozvojem reaktivních a regeneračních pochodů. Intenzitu těchto pochodů nejlépe vystihuje hodnota GOT, která mezi 26. — 28. dnem pokusu, kdy játra byla již téměř úplně reparována, byla zvýšena ještě o 41 %.

Z tohoto hlediska je u koní stanovení aktivity GOT také výhodnější, než stanovení aktivity sorbitdehydrogenázy (SODH). Na gr. 7 je znázorněn průběh změn aktivity jednak sérové GOT a jednak SODH po aplikaci CCl_4 , jak jej popsali Šindelářová a Neuman (24, 25). Ukazuje se, že do prvních 48 hod. po aplikaci látky, tj. ve stadiu rozvoje nekrobiotického procesu v játrech se výsledky těchto enzymatických reakcí navzájem vhodně doplňují. V dalším průběhu, kdy se vyvíjejí reaktivní a regenerační pochody, aktivita SODH klesá mnohem dříve a rychleji než aktivita GOT, takže již od pátého dne se blíží hodnotě před pokusem.

Aktivita GOT je naproti tomu stále ještě velmi významně zvýšena a její hodnota je v souladu se stupněm rozvoje reaktivních a regeneračních pochodů. Náhlý pokles SODH zřejmě souvisí především s rychlou eliminací nebo inaktivací enzymu. Stanovení aktivity SODH je proto účelné zejména v prvním období akutního poškození jater, kdy vhodně doplňuje hodnotu GOT. Zvýšená aktivita GOT není totiž specifickým ukazatelem charakterisujícím pouze funkční stav jater. Je-li však zároveň zvýšená aktivita GOT i SODH, nasvědčuje to tomu, že nekrobiotický proces je lokalizován v játrech. Je-li zvýšena jen aktivita GOT, může být nekrobiotický pochod umístěn také v jiném orgánu (např. v srdci, ve svalech, pankreatu apod.).



Graf 7. Dynamika změn aktivity GOT a SODH v séru koní po aplikaci CCl₄

Zatímco postupné snižování hladiny bilirubinu a zvyšování hladiny cholesterolu je možno vysvětlit normalizováním funkce jaterní tkáně, nelze dosud uspokojivě vysvětlit mechanismus, jímž se upravuje k normě aktivita S-GOT. Zdá se, že bezprostředně nesouvisí s reaktivními a regeneračními pochody v jaterní tkáni a že i velmi dobrá shoda, zjištěná mezi těmito pochody a aktivitou GOT v krevním séru je zřejmě pouze důsledkem pomalé eliminace nebo inaktivace enzymů. Tyto vztahy budou podrobněji studovány v další práci.

U pokusných koní nebyl zjištěn vztah mezi množstvím aplikovaného chloridu uhličitého a zvýšením aktivity S-GOT, množstvím bilirubinu a poklesem cholesterolu. Odpovídající změny uvedených ukazatelů byly však v dobré korelaci se stupněm nekrobiózy v jaterních punktátech. Z dynamiky změn aktivity sérové GOT lze proto usuzovat na stupeň poškození jaterní tkáně i na pravděpodobný průběh onemocnění.

Děkujeme Dr Kolařovi a Dr Královi ze Státního vědeckého veterinárního ústavu v Praze za velmi pečlivé provedení histologického vyšetření jaterních punktátů.

Dynamika změn aktivity sérové GOT a GPT ve vztahu k hladině celkového bilirubinu a cholesterolu s přihlédnutím ke klinickému průběhu onemocnění a k morfoloickým změnám jaterní tkáně byla studována u 6 koní po perorálním podání 0,1–0,27 ml chloridu uhličitého na 1 kg ž. v.

Nejpodstatnější změny všech uvedených biochemických ukazatelů byly zjištěny za 48–72 hod. po podání látky. V tomto časovém úseku byla aktivita sérové GOT zvýšena 6–7krát proti její hodnotě před pokusem, hladina celkového bilirubinu o 96–120 %, hladina celkového cholesterolu byla snížena o 25–28 %. Všechny tyto změny byly statisticky významné. Vzestup aktivity sérové GPT byl naproti tomu zcela bezvýznamný.

Velmi těsná a statisticky významná korelace byla prokázána mezi hladinou celkového bilirubinu a celkovým cholesterolem ($r=0,760$, $B=0,57$). Poněkud volnější byl vztah mezi aktivitou sérové GOT a celkovým bilirubinem ($r=0,429$, $B=0,18$) a zcela bezvýznamná byla korelace mezi aktivitou sérové GOT a celkovým cholesterolem ($r=0,112$, $B=0,012$).

Všechny uvedené změny byly v souladu s klinickým průběhem onemocnění a s histologickým nálezem na jaterních punktátech. Ve stejném časovém intervalu (48–72 hod. po podání látky) byly totiž jak klinické projevy u pokusných koní, tak i morfoloické změny jaterní tkáně nejzjevnější. Zvýšená aktivita GOT, zvýšení hladiny bilirubinu a pokles hladiny cholesterolu souvisely s rozvojem nekrobiotických pochodů v jaterní tkáni. Následující postupný návrat uvedených hodnot k jejich úrovni před pokusem byl v souladu s rozvojem reaktivních a regeneračních pochodů. Hladina bilirubinu a cholesterolu se upravovala k normě již 7. den pokusu. Intenzitě regeneračních pochodů proto nejlépe odpovídala aktivita sérové GOT, která byla poněkud zvýšena také ve fázi, v níž jaterní tkáň byla již téměř úplně reparována, tj. 26.–28. den po podání látky. Souvisí to zřejmě s pomalou eliminací nebo inaktivací enzymů. Tyto vztahy budou podrobněji studovány v další práci.

Na základě získaných výsledků lze proto doporučit stanovení aktivity sérové GOT a SODH jako vhodného testu pro laboratorní diagnostiku akutních jaterních onemocnění koní.

Literatura

1. Maděrová V., Neuman V.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 423, 1960. — 2. Neuman V., Maděrová V.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 433, 1960. — 3. Neuman V., Maděrová V.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 809, 1960. — 4. Maděrová V., Neuman V.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 819, 1960. — 5. Neuman V., Maděrová V., Zendulka M.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 6 (XXXIV), 241, 1961. — 6. Cornelius Ch. E., Bishop J., Switzer J., Rhode E. A.: Reprinted from Cornell Veterinarian, Vol. XLIX, 1, 1959. — 7. Šlesinger L., Továrek J.: Vet. čas. 8, 583, 1959. — 8. Horák M., Jícha J., Sova Zd.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 4 (XXXII), 961, 1959. — 9. Hudeček V.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 469, 1960. — 10. Gürtler H., Richter H.: Zblatt f. Veterinärmed. 6, 705, 1959. — 11. Konrád J.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 669, 1960. — 12. Sova Zd., Jícha J., Horák M.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 5 (XXXIII), 155, 1960. — 13. Šlesinger L.: Sborník ČSAZV - Vet. med. 4 (XXXII), 949, 1959. — 14. Lettow E.: Berl. u. münch. Tierärztl. Wschr. 73, 25, 1960. — 15. Reitman S., Frankel S.: Am. J. clin. Pathol. 28, 56, 1957. — 16. Jendrassik L., Gróf P.: Biochem. Z. 297, 81, 1938. — 17. Berger H. J.: Zblatt f. Veterinärmed. 3, 272, 1956. — 18. Pearson S., Stern S., Mc Gavack T.: Anal. Chem. 25, 818, 1953. — 19. Maděrová V.: Sborník VŠZ v Brně; Spisy vet. fakulty 8, 235, 1960. — 20. Keil

- B., Šormová Z. a kol.: Laboratorní technika biochemie, ČSAV, Praha 1959. — 21. Weber E.: Grundriß der biologischen Statistik; VEB G. Fischer Verlag Jena, 1957. — 22. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: CH. Z. 127, 152, 1956. — 23. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: Clin. Chim. Acta 2, 70, 1957. — 24. Šindelářová K., Neuman V.: Aktivita sorbitdehydrogenázy krevního séra koní a morčat při experimentální toxické hepatitidě. Vet. čas. 1961 — v tisku. — 25. Neuman V., Šindelářová K., Továrek J.: Sborník ČSAZV-Vet. med. 6 (XXXIV), 215, 1961.

Динамика изменений активности сывороточной GOT и GPT после применения CCl₄ с учетом клинического течения болезни и морфологических изменений печеночной ткани

Автор исследовал динамику изменений активности сывороточной GOT и GPT по отношению к общему количеству билирубина и холестерина с учетом клинического течения болезни и морфологических изменений печеночной ткани у 6 лошадей после перорального применения 0,1—0,27 мл тетрахлорметана на 1 кг живого веса.

Самые существенные изменения всех приведенных биохимических показателей были установлены через 48—72 часа после применения вещества. В этом промежутке времени активность сывороточной GOT, по сравнению с ее активностью перед опытом, повысилась в 6—7 раз, количество общего билирубина увеличилось на 96—120 %, количество общего холестерина понизилось на 25—28 %. Все эти изменения оказались статистически значительными. Повышение активности сывороточной GPT, напротив, не имело никакого значения.

Очень тесная и статистически значительная корреляция была установлена между общим количеством билирубина и общим количеством холестерина ($r=0,760$, $B=0,57$). Несколько свободнее оказалось отношение между активностью сывороточной GOT и общим количеством билирубина ($r=0,429$, $B=0,18$) и совсем незначительной была корреляция между активностью сывороточной GOT и общим количеством холестерина ($r=0,112$, $B=0,012$).

Все указанные изменения соответствовали клиническому течению заболевания и гистологическому диагнозу на образцах печени, полученных путем биопсии. В одинаковом промежутке времени (48—72 часа после применения вещества) не только клинические признаки у подопытных лошадей, но и морфологические изменения печеночной ткани оказались наиболее явными. Повышенная активность GOT, повышение количества билирубина и снижение количества холестерина были связаны с развитием некробиотических процессов в печеночной ткани. Последующее постепенное возвращение приведенных величин к их уровню перед опытом соответствовало развитию реактивных и регенерационных процессов. Количество билирубина и холестерина возвращалось к норме уже на 7 день опыта. Поэтому интенсивности регенерационных процессов лучше всего отвечала активность сывороточной GOT, которая была несколько повышена также в то время, когда печеночная ткань была уже почти полностью репарирована, т. е. на 26—28 день после применения вещества. Очевидно, это связано с медленным выделением или инактивацией энзимов. Эти проблемы будут подробнее изучаться в дальнейшей работе.

На основании полученных результатов можно рекомендовать определение активности сывороточной GOT и SODH, как удобную пробу для лабораторной диагностики острых заболеваний печени лошадей.

Die Dynamik der Aktivitätsänderungen der Serum-GOT und -GPT nach Applikation von Tetrachlorkohlenstoff mit Berücksichtigung des Gesamtbilirubins und -Cholesterols und in Beziehung zum klinischen Verlauf der Erkrankung und zu den morphologischen Veränderungen des Lebergewebes

In der Arbeit wurde die Dynamik der Aktivitätsveränderungen der Serum-GOT und -GPT in Beziehung zum Gesamtbilirubin und -Cholesterol mit Berücksichtigung des klinischen Verlaufes der Erkrankung und der morphologischen Veränderungen des Lebergewebes bei sechs Pferden nach der Applikation von 0,1—0,27 ml CCl₄ auf 1 kg Lebendgewicht verfolgt.

Die wesentlichsten Veränderungen aller angeführten biochemischen Werte wurden in 48—72 Stunden nach Applikation des Tetrachlorkohlenstoffes festgestellt. In diesem Zeitabschnitt hat sich die Aktivität der GOT im Vergleich zu ihrem Werte vor dem Versuche 6—7 mal und der Wert des Gesamtbilirubins um 96—120 % erhöht, das Gesamtcholesterol dagegen um 25—28 % vermindert. Alle diesen Veränderungen waren statistisch von Belang. Der Anstieg der Aktivität der GPT war dagegen belanglos.

Eine sehr enge und statistisch bedeutsame Beziehung wurde zwischen dem Werte des Gesamtbilirubins und dem Gesamtcholesterol ($r = 0,760$, $B = 0,57$) nachgewiesen. Gewissermaßen lose war die Beziehung zwischen der Aktivität der GOT und dem Gesamtbilirubin ($r = 0,429$, $B = 0,18$) und ganz belanglos war die zwischen der Aktivität der GOT und dem Gesamtcholesterol ($r = 0,112$, $B = 0,12$).

Alle angeführten Veränderungen waren im Einklang mit dem klinischen Verlauf der Erkrankung und dem histologischen Befund am Lebergewebe. Im gleichen Zeitabschnitt (48—72 Stunden nach Applikation des Tetrachlorkohlenstoffes) waren nämlich sowohl die klinischen Erscheinungen bei den Versuchspferden, als auch die morphologischen Veränderungen des Lebergewebes am deutlichsten ausgeprägt. Die erhöhte Aktivität der GOT, die Steigerung des Bilirubinwertes und die Abnahme des Cholesterols hingen mit der Entwicklung der nekrobiotischen Vorgänge im Lebergewebe zusammen. Die nachfolgende allmähliche Rückkehr der angeführten Werte zu ihrem Niveau vor dem Versuche war im Einklang mit der Entwicklung der Reaktions- und Regenerationsvorgänge.

Der Bilirubin- und Cholesterolwert kehrte zur Norm schon am siebenten Tag des Versuches zurück. Der Intensität der Regenerationsvorgänge entsprach deshalb am besten die Aktivität der GOT, welche auch in der Phase, in der das Lebergewebe fast ganz wiederhergestellt war, d. i. am 26.—28. Tage nach der Applikation des Tetrachlorkohlenstoffes. Das steht offenbar mit der langsamen Enzymelimination oder Enzyminaktivierung im Zusammenhang. Diese Beziehungen werden in einer weiteren Arbeit eingehend studiert werden.

Auf Grund der gewonnenen Ergebnisse kann man die Bestimmung der Aktivität der GOT und SODH als geeigneten Test für die Laboratoriumsdiagnostik der akuten Lebererkrankungen der Pferde empfehlen.

Krevní obraz časně odstavených selat, odchovávaných s použitím chloramfenikolu

Картина крови рано отнятых поросят, выращиваемых с применением хлорамфеникола (синтомицина)

The Blood Picture in Early Weaned Piglets Reared Using Chloramphenicol

Leoš MANDEL, Jiří TRÁVNÍČEK, Lubor ŠIMEK
ČSAZV-VÚCHP, Kostelec n. Orli., oddělení biologie a fyziologie

Došlo dne 1. II. 1961

Úvod

Při odchovu selat, odstavených od prasnice 10.—20. den po narození, vyskytují se obvykle v prvním týdnu následujícím po časném odstavu průjmy, končící někdy i uhynutím. Za příčinu těchto průjmů je pokládáno patogenní působení jinak normální střevní mikroflóry, zvláště gramnegativních střevních tyčinek, po náhlém přechodu z výživy přirozené na výživu náhradní (G d o v i n, 1960, D u n n e, 1958).

Za nejúčinnější antibiotikum, které při preventivním podávání zabrání vzniku průjmů u časně odstavených selat, považujeme na základě výsledků našich pokusů chloramfenikol (M a n d e l aj. 1961).

Protože jsou však popsány případy, kdy dlouhotrvající podávání chloramfenikolu vyvolalo nepříznivé vedlejší působení na procesy krvetvorby, projevující se leukopenií či aplastickou anemií (např. D a m e s h e k, 1952, T r a u t m a n, 1952 aj.), sledovali jsme u selat ve zmíněných již pokusech s podáváním chloramfenikolu i krevní obraz.

V dostupné literatuře nenacházíme údaje o vlivu chloramfenikolu na krevní obraz selat. Záležitost je aktuální i s ohledem na časté terapeutické používání chloramfenikolu při průjmových onemocněních mláďat hospodářských zvířat a zvláště selat.

Předkládaná práce přímo navazuje na předchozí sdělení o účinku antibiotik na růst a zdravotní stav časně odstavených selat (Mandel aj. 1961), na které odkazujeme v některých podrobnostech, týkajících se růstu selat, výživy a spotřeby krmiv.

Materiál a metoda

Ke sledování bylo použito celkem 26 selat pocházejících ze tří vrhů, odstavených od prasnice 10. den po narození a krmených dále do 35. dne tekutou dietou,

skládající se ze sušeného odstředěného mléka, sojové mouky, oleje z pšeničných klíčků, glukózy, přídavku minerálních solí, solí mikroprvků a vitamínů. 1000 ml tekuté diety obsahovalo ve formě přídavku 250 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 20 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 18 mg MnCl_2 , 2 mg KJ, 1 mg CoCl_2 , 1200 MJ vitamínu A, 170 MJ vitamínu D₂, 2 mg aneurinu, 2 mg riboflavinu, 1 mg niacinu, 3 mg Capantothenátu, 1,2 mg pyridoxynu, 2 mg kyseliny listové, 200 mg cholinchloridu, 60 mg kyseliny askorbové a 0,08 orální jednotky B₁₂.

Po 35. dnu až do 56. dne byla selata krmena směsí koncentrovaných krmiv, která se skládala z ječného a ovesného šrotu, pšeničné mouky, pšeničných otrub, sušeného odstředěného mléka, rybí moučky, sušených kvasnic a minerálních solí.

Byly provedeny celkem tři pokusy s použitím vždy celých vrhů (10, 8, 8 ks); selata v každém pokusu byla rozdělena na dvě vzájemně vyrovnané skupiny.

V pokusu 1 dostávala selata pokusné skupiny od časného odstavu až do 42. dne po narození denně 100 mg chloramfenikolu *per os*, nuceně, ve vodní suspenzi, ve dvou dávkách (v 9 a 18 hod.).

V pokusu 2 dostávala selata pokusné skupiny chloramfenikol stejným způsobem a po stejnou dobu, jako odpovídající selata v pokusu 1; kontrolní selata dostávala stejnou dávku chlortetracyklinu.

V pokusu 3 dostávala selata první skupiny denní dávku 100 mg chloramfenikolu od časného odstavu do 42. dne, zatímco selata kontrolní dostala pouze tři dávky počínaje dnem časného odstavu.

Údaje o počáteční a konečné průměrné živé váze selat ve všech třech pokusech jsou uvedeny v tab. I.

I. Počet selat ve skupinách a průměrné živé váhy (kg)

Pokus číslo	Skupina	Počet selat ve skupinách	Průměrná živá váha selat	
			10. den po narození	56. den po narození
1	s chloramfenikolem	5	3,68	16,64
	bez chloramfenikolu	5	3,68	14,78
2	s chloramfenikolem	4	3,00	12,80
	s CTC	4	3,00	11,33
3	chloramfenikol do 42. dne	4	3,60	18,63
	chloramfenikol jen první tři dny	4	3,60	19,05

Krevní obraz byl sledován týdně u všech selat, počínaje 14. a konče 56. dnem po narození. Krev byla získávána z ušní žíly (*vena auricularis posterior*) nabodnutím.

Byly zjišťovány tyto ukazatele červeného krevního obrazu:

1. počet červených krvinek v 1 mm³ krve, s použitím mísících pipet, Hayemova roztoku a Bürkerovy komůrky
2. koncentrace hemoglobinu v g % v krvi hemometrem Sahli (GIM)
3. hematokrit podle Wintrobe-ho, s použitím heparinu.

Výpočtem byly zjištěny:

4. střední objem červené krvinky v μ^3

5. koncentrace hemoglobinu v erytromase, v g %.

Z bílého krevního obrazu byl určován:

6. počet leukocytů v 1 mm^3 krve s použitím Türkova roztoku, mísících pipet a Bürkerovy komůrky

7. leukogram. Nátěr na podložním sklíčku byl barven panopticky, diferenciací byla provedena podle Nikitina (1949).

Zjištěné hodnoty byly zpracovány graficky a variačně-statisticky. Pro hodnocení rozdílů bylo použito t-testu.

V ý s l e d k y

Počet červených krvinek v 1 mm^3 krve

V pokusu 1 byly zjištěny celkem nepravidelné a nepodstatné rozdíly mezi skupinami. V pokusu 2 a 3 je patrné snížení hodnot u selat, dostávajících chloramfenikol, statisticky významné 28. den po narození.

Koncentrace hemoglobinu v krvi

Jediný statisticky významný rozdíl byl zjištěn v pokusu 3, 28. den, v neprospekch skupiny dostávající chloramfenikol až do 42. dne po narození.

Hematokrit

28. den bylo zjištěno statisticky průkazné zvýšení v pokusu 1 u selat, dostávajících chloramfenikol. Proti tomu ve stejném stáří v pokusu 3 bylo zjištěno signifikantní snížení.

Střední objem červené krvinky

Průkazné zmenšení červené krvinky bylo proti kontrolní skupině zaznamenáno v pokusu 3 49. a 56. den u selat, dostávajících do 42. dne chloramfenikol. V ostatních dvou pokusech byly rozdíly statisticky nesignifikantní, za úvahu však stojí zmenšení objemu zaznamenané 49. a 56. den rovněž u skupin s chloramfenikolem.

Koncentrace hemoglobinu v erytromase

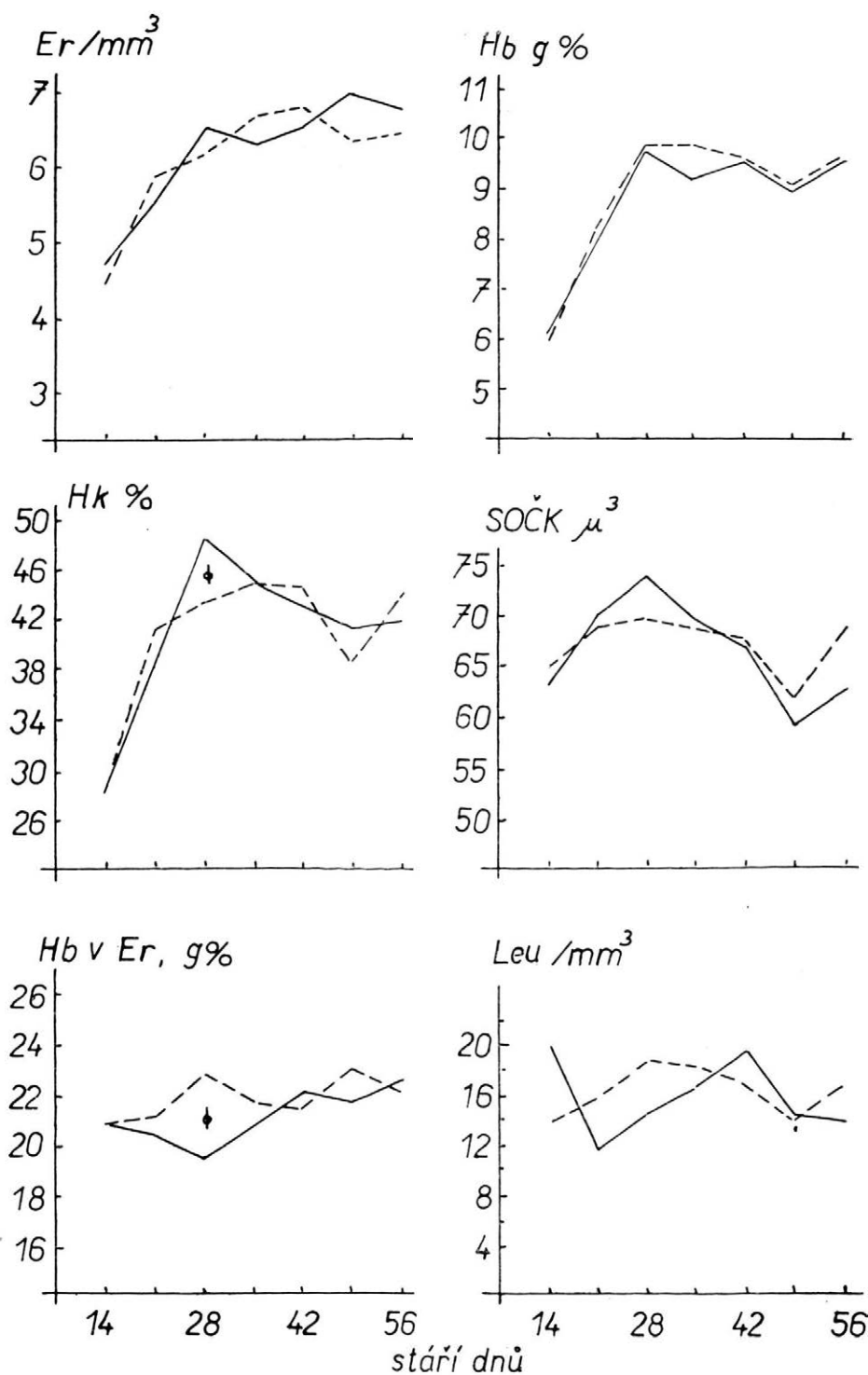
28. den po narození bylo zjištěno v pokusu 1 statisticky průkazné zmenšení koncentrace Hb u selat, dostávajících chloramfenikol. Ve stejnou dobu zjištěné zvýšení koncentrace u analogických skupin v pokusech 2 a 3 nebylo signifikantní.

Počet leukocytů v 1 mm^3 krve

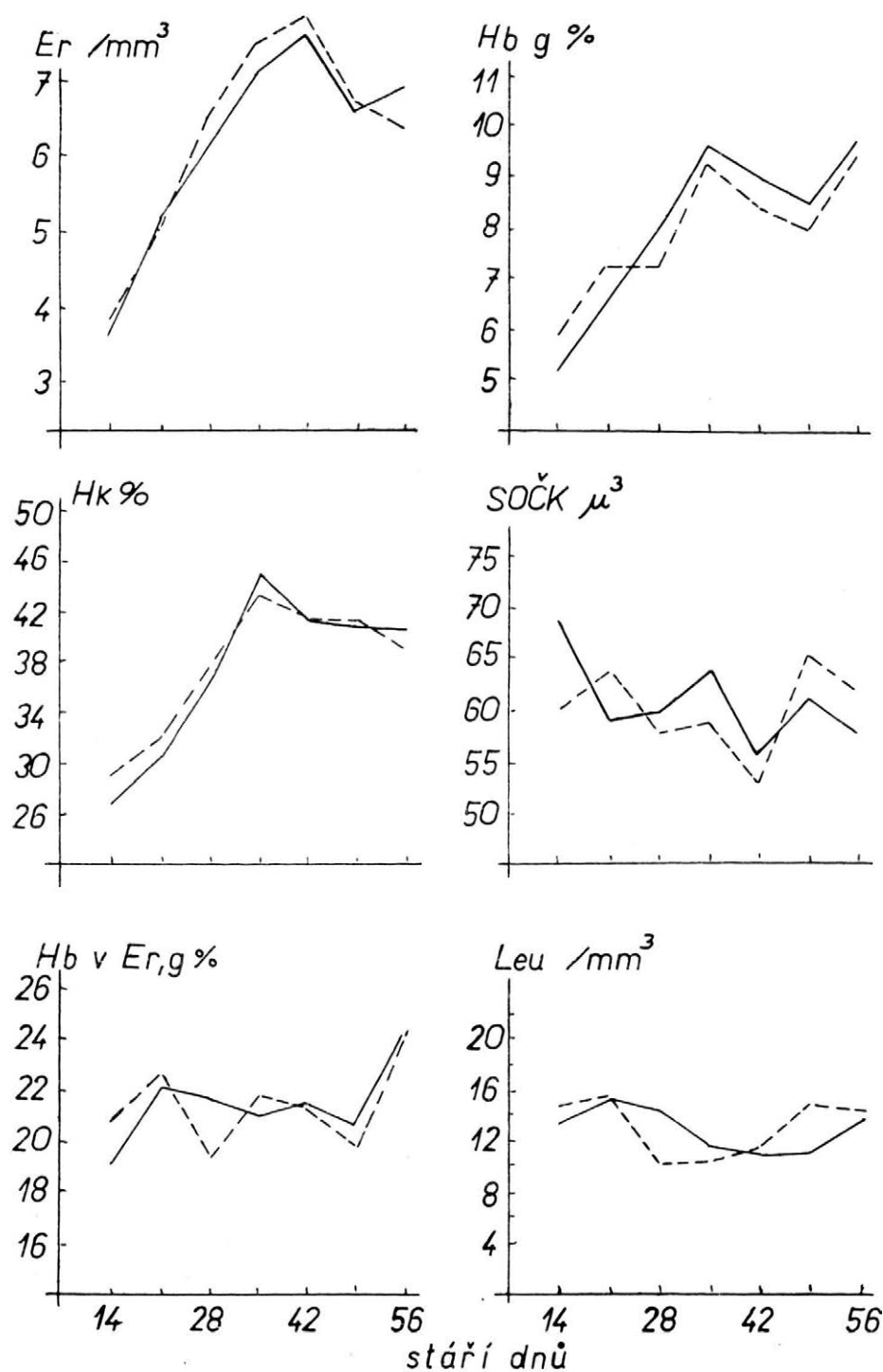
Nebyly zjištěny významné rozdíly, které by svědčily o útlumu tvorby leukocytů. V pokusu 1 jsme zaznamenali 21. a 28. den snížení počtu leukocytů u selat dostávajících chloramfenikol, které však nedosáhlo statisticky významných hodnot.

Diferenciální počet bílých krvinek

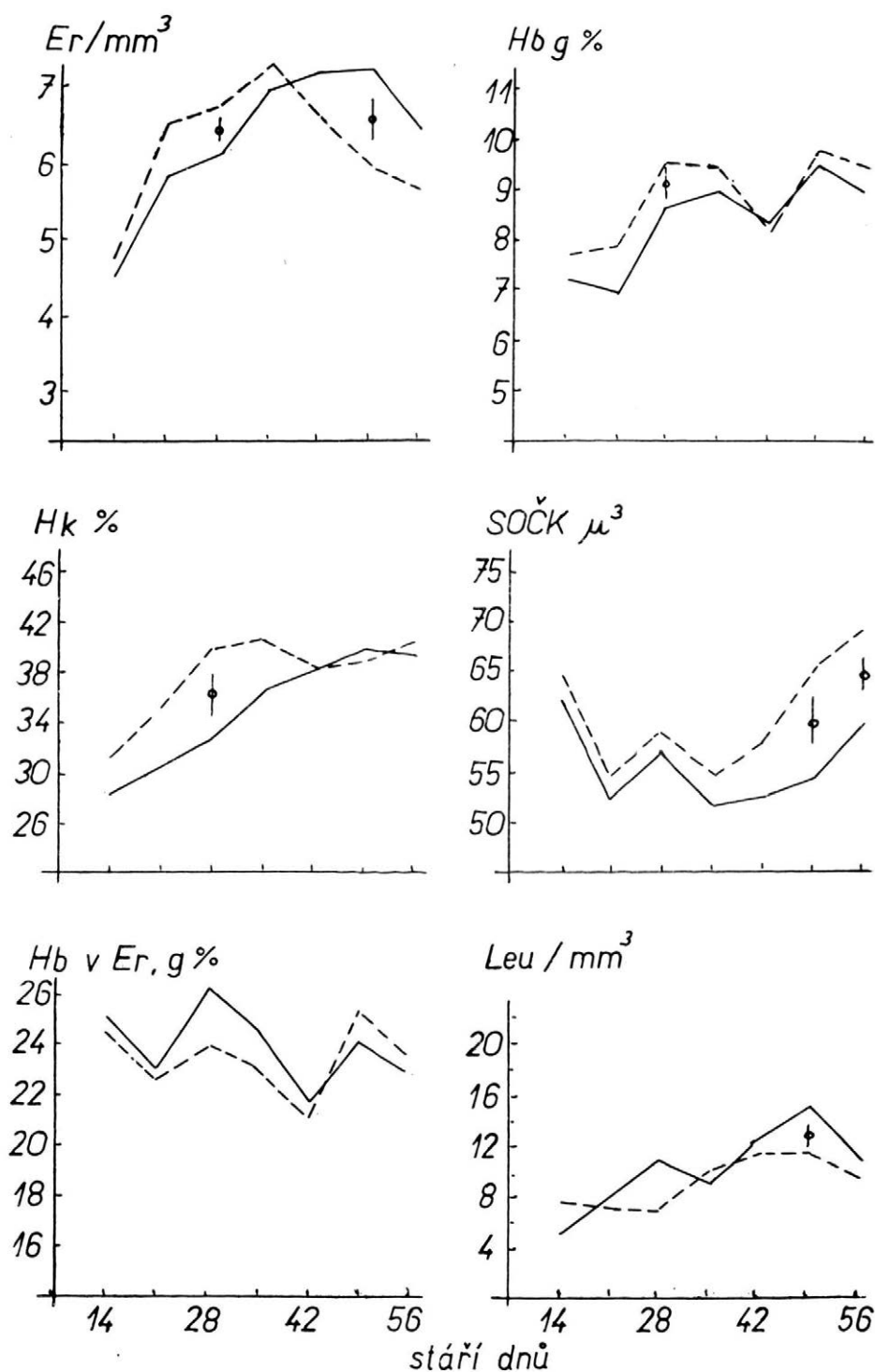
V pokusu 1 je zřejmo zvýšení zastoupení mladých forem neutrofilů u skupiny selat odchovávané bez antibiotik, patrné zvláště 21. a 28. den po narození.



Graf 1. Červený krevní obraz a počet leukocytů u selat v pokusu 1.
 Plná čára — selata dostávající od 10. do 42. dne 100 mg chloramfenikolu na kus a den
 Přerušovaná čára — selata odchovávaná bez antibiotik. $\emptyset = P < 0,05$



Graf 2. Červený krevní obraz a počet leukocytů u selat v pokusu 2.
 Plná čára — selata dostávající od 10. do 42. dne 100 mg chloramfenikolu na kus a den.
 Přerušovaná čára — selata dostávající od 10. do 42. dne 100 mg chlortetracyklinu na kus a den



Graf 3. Červený krevní obraz a počet leukocytů u selat v pokusu 3.
 Plná čára — selata dostávající od 10. do 42. dne 100 mg chloramfenikolu na kus a den.
 Přerušovaná čára — selata dostávající chloramfenikol v denní dávce 100 mg jen první tři dny po časném odstavu

V pokusu 2 bylo zaznamenáno zvýšení procentického zastoupení neutrofilů a mladých forem 14. den u skupiny s chloramfenikolem. Mezi skupinami v pokusu 3 nejsou patrné zřetelnější rozdíly v poměrném zastoupení jednotlivých forem leukocytů.

II. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 1, skupina s chloramfenikolem (n = 5)

Stáří dnů	Leukocyty (tis.)		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	19,8	1,1	0,6	0,9	0,1	2,9	4,4	12,6	20,0	77,4	1,1
21	11,4	1,4	2,4	0,2	—	2,4	6,1	13,6	22,1	71,3	4,0
28	14,1	1,6	1,6	0,4	—	1,8	8,4	8,3	18,5	76,4	3,1
35	16,3	2,1	1,2	0,3	—	1,5	7,8	16,4	25,7	70,7	2,1
42	19,7	1,8	0,1	1,3	—	0,9	14,3	20,1	35,3	62,0	1,3
49	14,1	1,7	—	0,9	—	1,1	18,3	23,2	42,6	55,2	1,3
56	13,9	1,2	—	1,1	0,1	1,5	18,3	23,3	43,2	54,7	1,0

III. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 1, skupina bez chloramfenikolu (kontrolní) (n = 5)

Stáří dnů	Leukocyty		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	13,6	1,1	2,1	0,5	0,4	3,8	7,2	10,1	21,5	72,6	3,3
21	15,7	1,8	2,4	0,3	0,2	6,6	11,8	13,2	31,8	61,5	4,0
28	18,4	1,9	1,7	0,7	0,1	3,8	7,2	13,6	24,7	70,8	2,1
35	18,1	2,1	0,6	0,7	0,1	3,8	7,6	16,0	27,5	69,9	1,3
42	16,8	1,6	0,2	1,4	0,3	2,0	12,8	22,4	37,5	59,6	1,3
49	13,8	1,7	—	1,3	—	0,9	16,8	27,0	44,7	52,5	1,5
56	16,5	1,4	—	0,6	—	1,9	16,7	27,5	46,1	51,8	1,5

IV. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 2, skupina s chloramfenikolem (n = 4)

Stáří dnů	Leukocyty		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	13,3	0,9	3,2	0,7	0,7	7,8	8,3	10,2	27,0	67,2	1,9
21	15,5	1,4	0,6	0,4	0,3	3,0	9,2	17,2	29,7	68,6	0,7
28	14,2	1,1	2,7	0,6	0,3	1,3	9,2	12,9	23,7	71,1	1,9
35	11,4	0,9	0,6	0,9	—	0,6	11,6	22,6	34,8	60,7	3,0
42	11,0	1,2	0,3	1,1	—	0,5	12,0	22,5	35,0	61,0	2,6
49	10,9	0,8	0,7	0,4	0,1	0,7	14,0	25,0	39,8	58,0	1,1
56	13,9	1,2	0,1	2,0	—	0,7	16,5	29,9	47,1	49,2	1,6

V. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 2, skupina s chlortetracyklinem (kontrolní) (n = 4)

Stáří dnů	Leukocyty		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	14,5	1,6	1,3	1,8	0,2	2,1	6,9	5,4	14,6	80,8	1,5
21	15,6	1,0	1,8	0,5	—	1,2	6,6	18,6	26,4	70,2	1,1
28	10,2	1,5	1,5	0,5	0,2	0,5	7,3	13,4	21,4	74,9	1,7
35	10,4	0,8	0,4	1,5	—	1,7	8,9	25,8	36,4	59,7	2,0
42	11,5	1,0	0,5	1,0	—	1,2	7,0	20,0	28,2	69,2	2,1
49	14,7	1,1	0,8	0,8	0,1	1,5	15,8	33,7	51,1	45,8	1,5
56	14,1	1,2	1,3	0,9	—	0,9	11,0	30,9	42,8	53,7	1,3

VI. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 3, skupina s chloramfenikolem od č. o. do 42. dne (n = 4)

Stáří dnů	Leukocyty		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	4,8	0,4	0,3	0,2	—	0,1	5,1	18,0	23,2	74,4	1,9
21	7,9	0,9	0,3	0,5	0,1	0,6	7,5	20,1	28,3	69,3	1,6
28	10,9	1,1	—	0,8	0,3	1,3	11,0	16,5	29,1	68,9	1,2
35	9,3	0,8	0,8	0,4	—	0,3	9,4	20,3	30,0	67,5	1,3
42	12,6	0,6	0,3	0,8	—	1,0	12,3	30,9	44,2	53,2	1,5
49	15,5	1,1	0,1	1,5	—	0,6	10,6	40,0	51,2	46,8	0,4
56	11,9	1,0	0,3	1,3	—	1,6	11,3	23,6	36,5	61,2	0,7

VII. Počet leukocytů a leukogram (v % bílých krvinek)

Pokus 3, skupina s chloramfenikolem jen první tři dny po č. o. (kontrolní) (n = 4)

Stáří dnů	Leukocyty		Baso- fily	Eosi- nofily	Neutrofily					Lym- focyty	Mono- cyty
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			miel.	ml. f.	tyč.	seg.	celkem		
14	7,7	0,6	0,3	—	0,1	1,4	12,9	17,9	32,3	66,1	1,3
21	7,3	0,9	0,4	0,4	—	1,0	7,6	16,6	25,2	72,7	1,3
28	7,6	0,9	0,1	0,4	0,1	1,3	8,5	15,0	24,9	73,2	1,4
35	10,2	1,1	—	0,6	—	1,2	8,7	22,6	32,5	66,3	0,6
42	11,8	0,9	0,3	1,0	—	2,5	15,6	22,9	40,0	57,8	0,9
49	11,3	0,9	0,3	2,9	—	2,1	12,6	24,7	39,4	56,8	0,6
56	10,0	1,0	0,3	0,6	0,1	1,6	17,4	26,6	45,7	53,0	0,4

Diskuse

Z křivek počtu erytrocytů, obsahu hemoglobinu v krvi a hematokritu u všech skupin je zřejmý prudký vzestup mezi 14. a 28.—35. dnem po narození. Tento průběh křivek je typický u selat, která dostávají dostatečné množství tzv. krve-
tvorných stopových prvků a byl již popsán řadou pracovníků (na př. K á b r t 1959, Dvořák 1960, Gdovin a Bartko 1960).

Při vyhodnocení rozdílů v krevním obrazu selat, která byla sledována v naší práci, je dostatečně zřejmo, že nedošlo k poklesům hodnot v červeném či bílém krevním obrazu, které by bylo možno hodnotit jako anemii nebo leukopenii.

Nebezpečí toxicity chloramfenikolu, projevující se především anemií a neutropenií, není zřejmě takové, aby mohlo zabránit použití tohoto antibiotika v námi použitých dávkách.

Tento názor je možno podepřít údaji Š a r m a n o v a (1959), který uvádí, že chronické podávání chloramfenikolu v dávce 50 mg/kg ž. v. u laboratorních zvířat nevyvolalo změny v krevním obrazu; pokles hodnot KO zaznamenal až při dávkách 250 mg/kg ž. v. W i t t s (1953) odhaduje, že nebezpečí aplastické anemie po chloramfenikolové terapii je pouze asi 1 : 100 000 až 1 : 10 000.

Souhrn

Byl zkoumán vliv chloramfenikolu na krevní obraz selat, odstavených 10. den po narození a živých náhradní potravou do 56. dne. K pokusům bylo použito celkem 26 selat, pocházejících ze tří vrhů. Chloramfenikol byl selatům v pokusných skupinách podáván *per os* v denní dávce 100 mg na kus a den od časného odstavení do 42. dne po narození. Tři kontrolní skupiny se skládaly ze selat, která byla rovněž časně odstavena a odchovávána 1. bez použití antibiotik, 2. s použitím chlortetracyklinu v dávce 100 mg/kus/den, 3. s použitím denních dávek 100 mg chloramfenikolu pouze po dobu prvních tří dnů po časném odstavení.

Snížení počtu červených krvinek, koncentrace hemoglobinu v krvi a erytromase ve srovnání s kontrolními skupinami bylo patrné pouze v několika případech 28. den po narození.

V žádném případě nebyly zjištěny hodnoty, které by mohly být charakterizovány jako anemie, případně leukopenie.

Literatura

1. D a m e s h e k W.: Chloramphenicol and the bone marrow. - Blood, 7: 755-756, 1952. — 2. D u n n e H. W.: An expanding concept of colibacillosis with emphasis on the disease in swine. - Can. J. Comp. Med. Vet. Sci., 23:101-108, 1959. — 3. D v o ř á k M.: Změny v morfologii erytrocytů při vývoji anemie selat. - Sb. ČSAZV - Vet. med., 5:257-266, 1960. — 4. G d o v i n T., B a r t k o P.: K prevenci anemie prasiatok intramuskulárnou aplikací komplexu dextranu železa. - Veterinářství, 10:56-57, 1960. — 5. G d o v i n T.: Umělý odchov prasiatok z hlediska zdravotnej problematiky. - Referát na věd. konferenci o odchovu prasiatok, Biely Váh, 29. 9. 1960 (nepubl.). — 6. K á b r t J.: Využití krvetvorných minerálií u selat a rostoucích prasat. - Sb. VŠZ Brno, B, 7:307-325, 1959. — 7. M a n d e l L., S y ř í n e k F., L a n c A.: Příspěvek ke studiu účinku antibiotik u časně odstavených selat. - Sb. ČSAZV - Živ. výr., 6: 401-412, 1961. — 8. N i k i t i n V. N.: Atlas kletok krovi selkochozjajstvennyh i laboratornyh životnyh. - Selchozgiz, Moskva, 1949. — 9. Š a r a b r i n T. Š.: Izměnění kartin krovi pod vlijanijem sintomicina. - Farmakol. Toxikol., 22:440-445, 1959. — 10. T r a u t m a n n H.: Blutbildungsschädigung bei Chloramphenicoltherapie. - Z. ges. inn. Med. Grenzgebiete, 7:55-56, 1952. — 11. W i t t s L. J.: Chloramphenicol and risk of toxicity. - Praktitioner, 170:87, 1953.

Картина крови рано отнятых поросят, выращиваемых с применением хлорамфеникола (синтомицина)

Исследовалось влияние синтомицина на картину крови поросят, отнятых на 10 день после рождения и выращиваемых на синтетической диете до 56-дневного возраста. Опыты проводились с 26-ю поросятами из 3 опоросов. Синтомицин давали поросятам *per os*. Суточная дача составляла 100 мг на голову, начиная с 10-дневного и кончая 42-дневным возрастом. Три контрольные группы состояли из рано отнятых поросят, выращиваемых: 1. без применения антибиотиков, 2. с добавлением хлортетрациклина в дозе 100 мг на голову в сутки и 3. с применением синтомицина (100 мг на голову в сутки) в течение первых 3-х дней после раннего отъема.

Наблюдаемое в отдельных случаях по сравнению с контрольными группами снижение количества эритроцитов и концентрация гемоглобина в крови и эритромассе были заметны только в некоторых случаях на 28 день после рождения.

Полученные данные показывают, что ни в коем случае нельзя обозначить это явление как анемию или лейкопению.

The Blood Picture in Early Weaned Piglets Reared Using Chloramphenicol

Studied was the influence of chloramphenicol on the blood picture of baby pigs, weaned at 10 days after birth and then artificially fed.

The experiments involved on the whole 26 piglets from three litters. The piglets got in the treated groups chloramphenicol *per os* in a daily dose of 100 mg per pig from early weaning to the 42nd day of age. The three control groups involved pigs also early weaned and reared 1) without any antibiotics, 2) using chlortetracycline in a dose 100 mg per pig daily, 3) using daily doses of 100 mg chloramphenicol but only the first three days after early weaning.

A decrease of the red blood cell count, the haemoglobin level in blood and in the red blood cells, when compared with the control groups, was ascertained only in a few cases on the 28th day after birth.

In no case there were ascertained values, which might be characterized as anemia or leukopenia.

Stabilizace L-formy *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Стабилизация Л-форм *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Stabilization of L-forms of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Boris SKALKA

Katedra mikrobiologie a zoohygieny veterinární fakulty VŠZ v Brně, vedoucí doc.
MVDr. L. Černý

Došlo dne 16. XI. 1960

Úvod

Stabilizace experimentálně získané L-formy mikroorganismů se objevuje v poslední době jako nutný požadavek pro hodnocení pozitivní či negativní schopnosti zárodku vytvořit pravé L-formy. Při dosavadním způsobu posuzování morfologických změn mikroorganismů, které byly vystaveny účinku vhodné látky, byly totiž často téměř všechny změny bakteriálních buněk nesprávně hodnoceny a shrnovány pod pojem L-forma.

Ve snaze vyloučit toto přehodnocování morfologické reakce bakteriální buňky na určitý faktor, doporučovali Tulasne a spol. (1954) diferencovat vzájemně skutečný L-cykklus — charakterizovaný tvorbou gigantických tělísek, filtrovatelné fáze a typických L-kolonií — a cyklus M, kdy nevzniká ani filtrovatelná fáze, ani se nevytvoří typické L-kolonie. Autoři tohoto názoru se domnívají, že skutečný L-cykklus lze vyvolat jenom u protea a některých kmenů vibrií.

Klienebergerová-Nobelová (1957) rovněž navrhuje používat termínu L-forma jenom pro ty formy růstu, které jsou charakteristické především svými koloniemi s hutným centrem vrůstajícím do agarového media a s periferní zónou tvořenou vakuolizovanými gigantickými tělisky.

Táž autorka (Klieneberger-Nobel 1959) charakterizuje L-formu jako označení svérázného růstu charakteristického především koloniemi, které neobsahují žádné bakteriální buňky. L-formy tvořící L-kolonie nemají substance obsažené v buněčné stěně bakterií zejména kyselinu diaminopimelinovou a komplex kyseliny muramové a uridinnukleotid peptidu. Doporučuje, aby při posuzování L-formy růstu se kladl důraz především na schopnost stabilizace L-kolonií bez možnosti jejich reverze v bakteriální buňky; jenom tak by bylo možné vyloučit řadu omylů.

Nermut (1960) popisuje čtyři odlišné typy L-cyklu. Naznačený L-cykklus — při kterém dochází k tvorbě gigantického (velkého kulatého) tělíska z bakteriální buňky s následným rychlým odštěpováním normálních bakterií.

Neúplný L-cyklus — při tomto se buňky výchozí kultury mění v gigantická tělíska. Ve stadiu gigantických tělísek zanikne jich přibližně 70–80 %. Zbývající tělíska jsou schopna regenerace v původní bakterie.

Úplný L-cyklus — při němž dochází k vytvoření L-kolonií z nichž se po určité době počnou odštěpovat normální bakterie.

Přerušný L-cyklus u něhož dochází ke stabilizaci L-kolonií, které lze pasážovat aniž dojde k jejich reverzi v bakteriální formu.

Dosažení vzniku L-kolonií se při použití správné metodiky zdařilo u mnoha gramnegativních a grampozitivních mikroorganismů, jejichž přehled jsme uvedli v předchozí práci (Skalka 1960). Problematickou je otázka jejich dalšího pomnožení. Často docházelo při jejich pasážování k reverzi ve výchozí kmen, jako u *Proteus vulgaris* a *Salmonella typhimurium* (Silberstein 1953), nebo byl jejich přenos zcela negativní (Rada 1958) u *Haemophilus Pfeifferi*.

Stabilní L-formu popisují u *Proteus vulgaris* Kandler a spol. (1956) a Lavillaureix (1954) u *Vibrio cholerae*. Ward a spol. (1958) popisují stabilní L-formy u streptokoků. Lederberg a spol. (1958) při pasážování L-formy růstu *Escherichia coli* docílili stabilní formy jen při pasážování na půdách s vysokou koncentrací penicilínu. Na půdách bez penicilínu docházelo v jejich pokusech k reverzi v bakteriální formy. K dosažení stabilních forem byla nutná přísada diaminopimelinové kyseliny k živné půdě. Gilmore a spol. (1959) dosáhli stabilních L-form jejich pasážováním na polotekutém mediu s thioglykolátem sodným až po třetí pasáži. V prvních dvou byla nutná přítomnost penicilínu v mediu, jinak docházelo k reverzi L-form.

Ve své předchozí práci (Skalka 1960) popisujeme L-formy *Erysipelothrix rhusiopathiae* vzniklé vlivem penicilínu. Při našich tehdejších pokusech jsme zjišťovali poměrně častou reverzi získaných L-kolonií v sekundární tyčinky shodné s použitými výchozími kmeny.

V dalším studiu L-cyklu červenkových tyčinek jsme se zaměřili na otázku možnosti jejich stabilizace.

Materiál a metodika

Ke studiu možnosti stabilizace jsme namátkově vybrali 7 kmenů *Erysipelothrix rhusiopathiae* (dále ER). 6 kmenů jsme vybrali ze 30 ústavních kmenů, u kterých se nám zdařilo vyvolat penicilínem morfologické změny a vznik L-kolonií (Skalka 1960). Jeden kmen byl nově izolován z orgánů běhouna v diagnostické laboratoři ústavu.

Kultivační pokusy jsme prováděli na agarových půdách z hovězího srdce obohacených 25 % čerstvého inaktivovaného koňského séra. K půdám jsme přidávali penicilín G (Spofa).

Získání L-kolonií z bakteriálních buněk ER jsme prováděli založením kultury na agarovém bloku s obsahem penicilínu v mediu 0,1 m. j./ml.

Vyrostlé L-kolonie jsme po suspendaci ve fyziologickém roztoku pasážovali na živnou půdu.

Poněvadž na agarovém bloku zůstávají zbytky lyzovaných gigantických tělísek (large bodies) a současně vzniká velký počet L-kolonií, nebylo možné provést první subkulturu z jediné L-kolonie. Suspendovali jsme proto vyrostlé L-kolonie přímo na agaru a jednak přenášeli na svěží živnou půdu, jednak jsme jejich další suspendací v 1 ml fyziologického roztoku připravili „stock“ kulturu, ze které jsme rovněž kultivovali.

Stejným způsobem jsme pasážovali i stabilizované L-kolonie, které jsme později pomnožovali aerobně na Petriho miskách.

Vznik a rozvoj L-kolonií jsme pozorovali intravitálním sledováním preparátů ve fázovém kontrastu.

V ý s l e d k y p o k u s ů

Pokusy jsme nejdříve založili se dvěma ústavními kmeny ER₂₂ a ER₂₉. U obou kmenů jsme docílili popsanou metodikou (Skalka 1960) vzniku L-kolonií z bujonové kultury červenkových zárodků na sérovém agaru s 0,1 m. j. penicilínu na 1 ml.

První pasáž L-kolonií jsme prováděli vždy na agarovém bloku. Po kultivaci jsme prohlédli celý blok a zaznamenali si podle křížového posuvu stolku zorná pole, v nichž se vyskytlo gigantické tělísko, přenesené vesměs z periferie L-kolonií. Gigantická tělíska jsme však nacházeli jen zcela ojediněle a sledováním kultury jsme ani v jednom případě nezjistili jejich další rozvoj. Tato tělíska propadala vždy lyzi.

Asi po 14–16 hod. od kultivace jsme na živné půdě zjišťovali shluky granul, která jak ukázalo další sledování jejich rozvoje, dávala vznik centru příští L-kolonie (obr. 1), nebo jsme v menším procentu případů nacházeli nejdříve malá gigantická tělíska (obr. 4), která se velmi rychle rozrůstala a jejichž další osud byl dvojitý. Buď vznikla po krátké době v jejich středu granulózní zóna, kolem níž se z periferie tělíska vytvářel typický voštinovitý okraj L-kolonie (obr. 5 a 6) nebo se gigantické tělísko rozrůstalo (obr. 11) a po dalších 70–90 hod. propadalo lyzi.

V preparátech však nejčastěji vznikaly L-kolonie prvně popsaným způsobem, tj. nejdříve se vytvořil střed granulí, která počala vrůstat do živného media a kolem něhož se rychle vytvářela periferní zóna (obr. 2). V prvních hodinách rozvoje byla tato zóna téměř jednolitá s naznačenou tvorbou vakuol a kruhovitě centrum nebylo nijak zřetelně od periferie odděleno, ale přecházelo v ní plynule.

Po dalších 12–24 hod. od počátečního vzniku nových L-kolonií došlo k zřetelnému ostrému oddělení voštinovité periferie od granulárního centra (obr. 3). Celkem jsme mohli odlišit 3 typy L-kolonií. První dva typy se od sebe lišily jen velikostí. Oba odpovídají Dienesově klasifikaci 3 B, první typ (obr. 3) se však svou velikostí podobá více typu 3 A, kolonie jsou drobné a jejich periferní zóny téměř vždy splývají. Druhý typ se téměř kryje s Dienesovou klasifikací 3 B. Kolonie jsou velké, mají v průměru přes 0,5 mm a centrum je obklopeno širokou periferní zónou (obr. 7).

Třetí typ L-kolonií je zcela zvláštní. Vedle velkého granulárního centra L-kolonie se vytváří ještě lem sekundárních center a teprve kolem těchto je voštinovitý periferní lem (obr. 8).

Během pasážování jsme ředěním „stock“ kultury dosáhli, že nám na agarovém bloku vyrostla i jen jediná L-kolonie, nebo několik málo kolonií stejného typu. Při jejich dalším pasážování jsme zjistili, že jednotlivé růstové typy kolonií mohou v sebe vzájemně přecházet a pasážováním nelze docílit jejich typovou stabilizaci.

V primokulturách vznikaly L-kolonie na živných půdách s 0,05–0,1 m. j./1 ml penicilínu.

Z těchto jsme zakládali subkultury na půdách bez penicilínu a na půdě se stejným obsahem penicilínu jako byl agar na němž došlo ke vzniku L-kolonií.

V první pasáži nám L-kolonie kmene ER 22 vyrostly jak na půdě bez penicilínu, tak i na agaru s 0,1 m. j./1 ml, L-kolonie z kmene ER 29 vyrostly pouze

na agaru s penicilínem. Na agaru bez penicilínu vyrostly jen kolonie složené z normálních červenkových tyčinek. Poněvadž ani první ani druhá pasáž L-kolonií ER 22 nejevila na agaru bez penicilínu tendenci k reverzi v bakteriální formy, a stejné vlastnosti měla i 2. pasáž L-kolonií ER 29, opakovali jsme pokus s touto kulturou znovu a současně se pokusili o stabilizaci L-kolonií dalších červenkových kmenů a to ER 30, ER 32, ER 21, ER 27, ER 12. Tentokrát ani v jednom případě jsme po první subkulturaci nepozorovali růst jiných kolonií, než kolonií L.

V druhém pokuse s novými 5 kmeny jsme první subkultury L-kolonií zakládali na agarech s obsahem penicilínu 0, 0,1, 1, 10, 100, 500, 1000 a 5000 m. j./1 ml. U těchto kmenů jsme vždy dosáhli růstu L-kolonií na všech uvedených koncentracích penicilínu v agarovém mediu.

Všechny kmeny jsme se rozhodli pasážovat současně na agarech s obsahem penicilínu 0 a 1000 m. j./1 ml živné půdy. Po pěti pasážích kultivujeme z penicilínových půd na půdy bez penicilínu, abychom vyloučili možnost adaptace na penicilín nebo snížení rezistence vůči jeho obsahu v půdě. Ačkoliv kmeny ER 22 a ER 29 jsou t. č. v 50 pasáži, kmeny ER 30, ER 32 a ER 12 v pasáži 40 a kmeny ER 29b, ER 27 a ER 21 v 30 pasáži neshledali jsme v schopnosti růstu při zkřížených kultivacích žádné rozdíly. Asi po 6–8 pasáži stabilizovaných L-kolonií se jejich rozvoj urychluje a kolonie jsou dobře narostlé již po 36 hod. inkubace.

Pozornost zaměřujeme zejména na L-formy, které pasážujeme na půdách bez penicilínu. Ani u jednoho z použitých kmenů jsme nepozorovali tendenci k jejich reverzi v původní bakteriální formu.

Orientačně jsme provedli opakovanou kultivaci na agary s obsahem octanu thallného, který je pro své bakteriostatické účinky doporučován pro izolaci PPL organismů a nemá schopnost stimulovat zárodky k přechodu do L-formy.

Zatím co výchozí červenkové kmeny byly zcela inhibovány ve svém růstu již v koncentraci 1 : 2500 taliumacetátu v sérovém agaru, vyrůstaly jejich stabilizované L-formy až do koncentrace 1 : 500 v sérovém agaru. Rozvoj L-kolonií na půdách s taliumacetátem byl stejný jako na půdách s penicilínem či bez penicilínu. Rozdíl ve vzhledu L-kolonií byl pouze v tom, že střed L-kolonií po 3–5 denní inkubaci nabyl intenzivní hnědočerné barvy, což pravděpodobně svědčí o zachovalé schopnosti produkce H_2S .

L-kmeny jsme se pokusili pasážovat i za aerobních podmínek na agaru s inaktivovaným koňským sérem, který jsme nalili na Petriho misku.

Kmeny ER 22 a ER 29A jsme začali takto pasážovat od jejich 5. pasáže na agarových blocích, kmeny ER 30, ER 32 a ER 12 od 3. pasáže a konečně u kmenů ER 21, ER 27 a ER 29B jsme docílili jejich růstu hned v první subkulturaci z bloků, na nichž vznikly z bakteriálních forem.

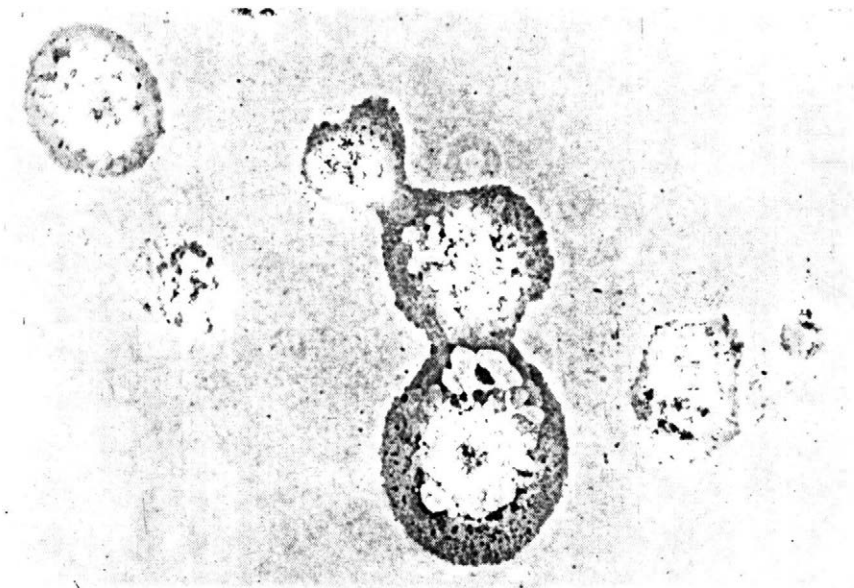
Všechny kmeny rostou velmi dobře i za aerobních podmínek. Jejich překultivaci provádíme stejným způsobem jako z bloků, tj. Pasteurovou pipetou. K makroskopicky viditelnému růstu L-kolonií dochází vždy již po 24–36 hodinách. Pasážované kmeny podrobujeme dalšímu studiu, zejména na zjištění jejich biochemických a antigenních vlastností.

Diskuse

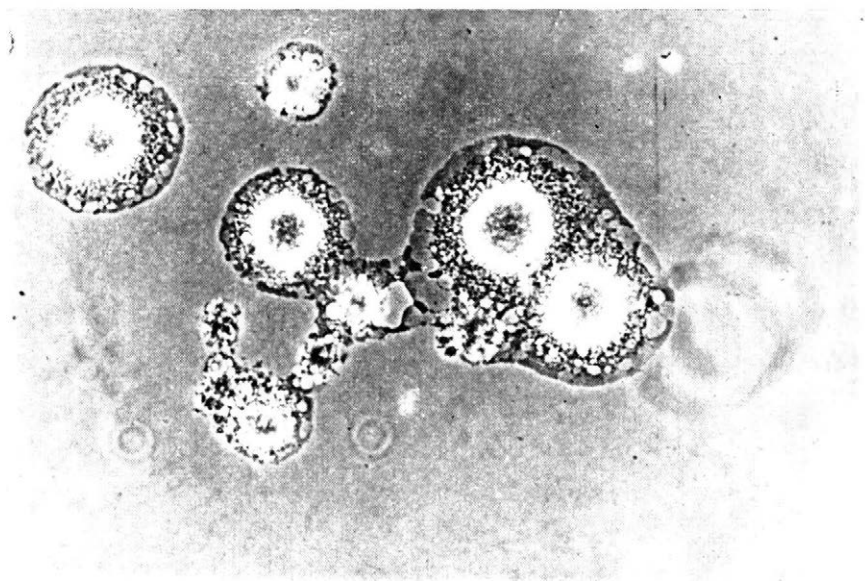
Při srovnání námi dosažených výsledků při pokusech o stabilizaci L-forem růstu *Erysipelothrix rhusiopathiae* s výsledky kterých dosáhli Rada u *Haemophilus pfeifferi*, Lederberg u *Escherichia coli* je velmi nápadná rychlá sta-



1. Vznikající centrum L-kolonie po 16 hod. od založení subkultury. Fázový kontrast, zvětš. 1500 X



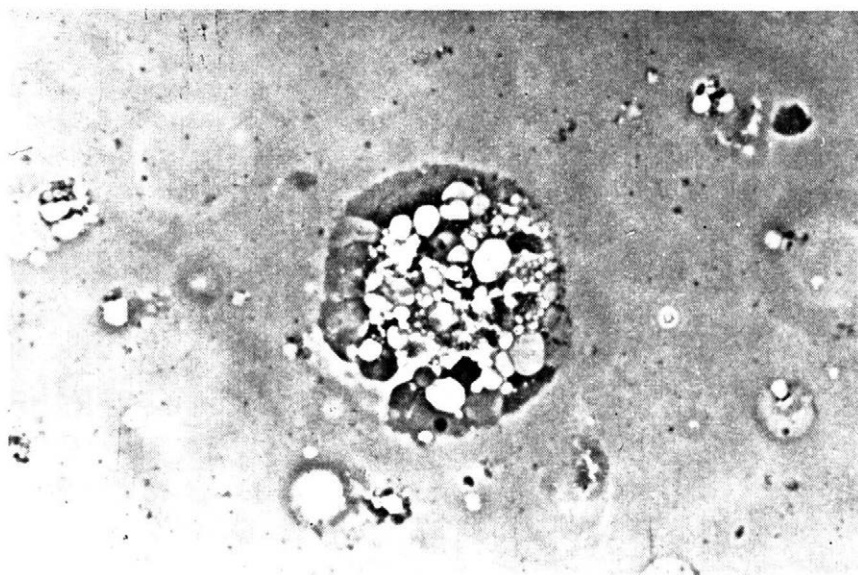
2. Rozvíjející se L-kolonie za 36 hod. od kultivace. Fázový kontrast, zvětš. 400 X



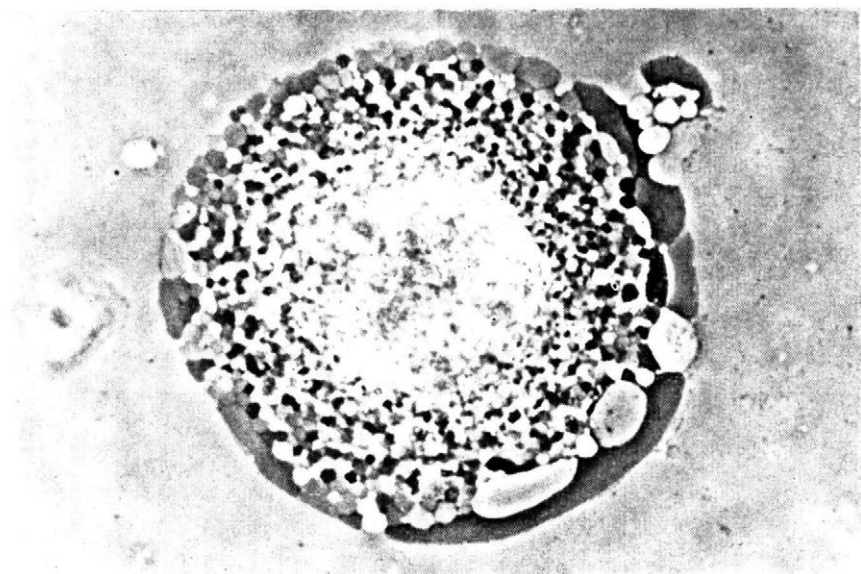
3. Rozvinutá L-kolonie *Erysipelothrix rhusiopathiae* menších rozměrů; 48 hod. po kultivaci. Fázový kontrast, zvětš. 200×



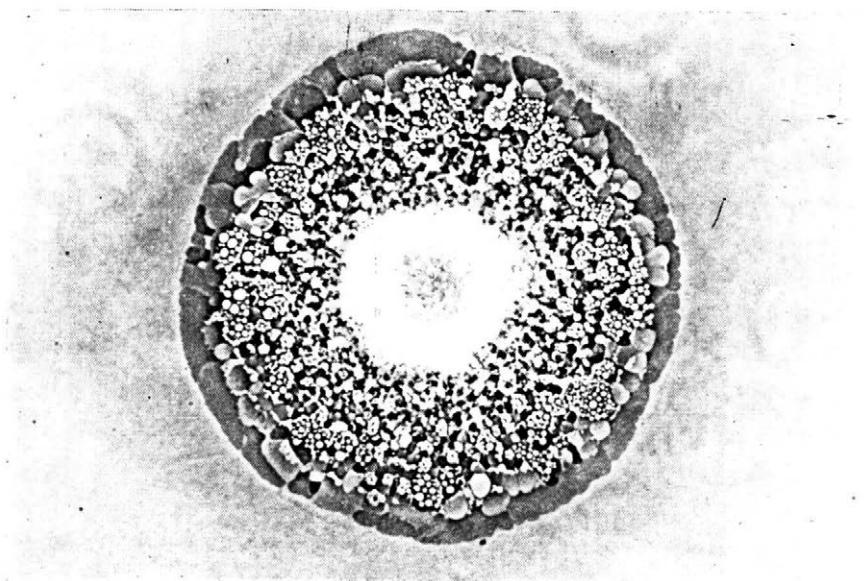
4. Vznik centra L-kolonie rozpadem ve středu gigantického tělíska za 24 hod. po kultivaci. Fázový kontrast, zvětš. 300×



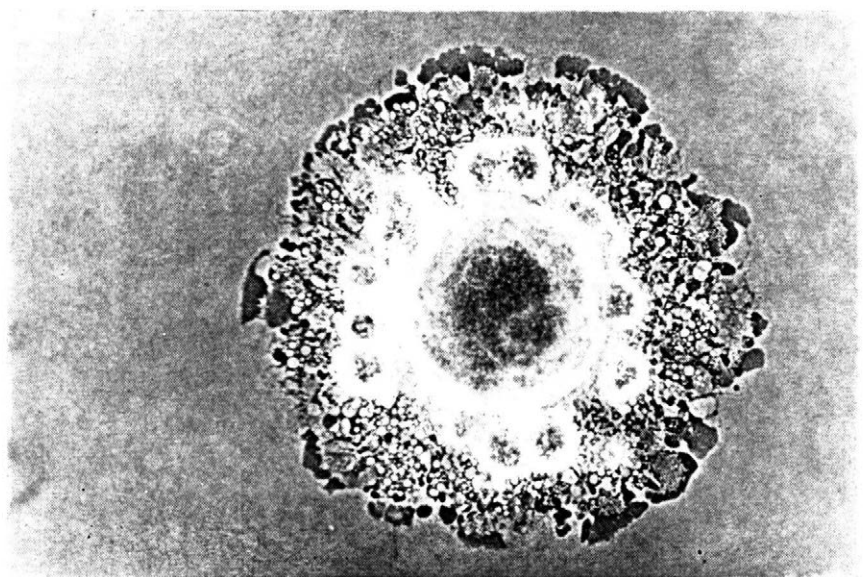
5. Narůstání periferní zóny kolem nové L-kolonie, vzniklé z gigantického tělíska;
36 hod. po kultivaci. Fázový kontrast 200 X



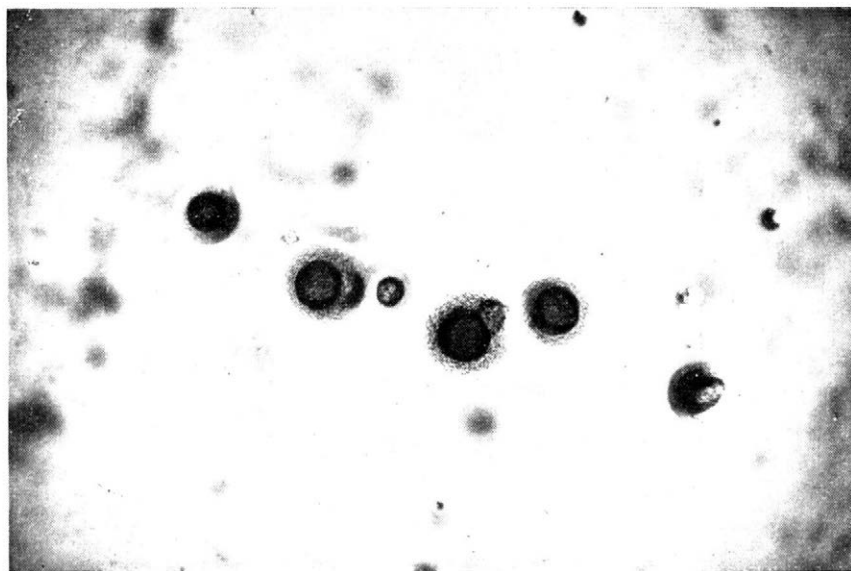
6. Rozvíjející se L-kolonie vzniklá z gigantického tělíska; 48 hod. po kultivaci. Fázový
kontrast, zvětš. 200 X



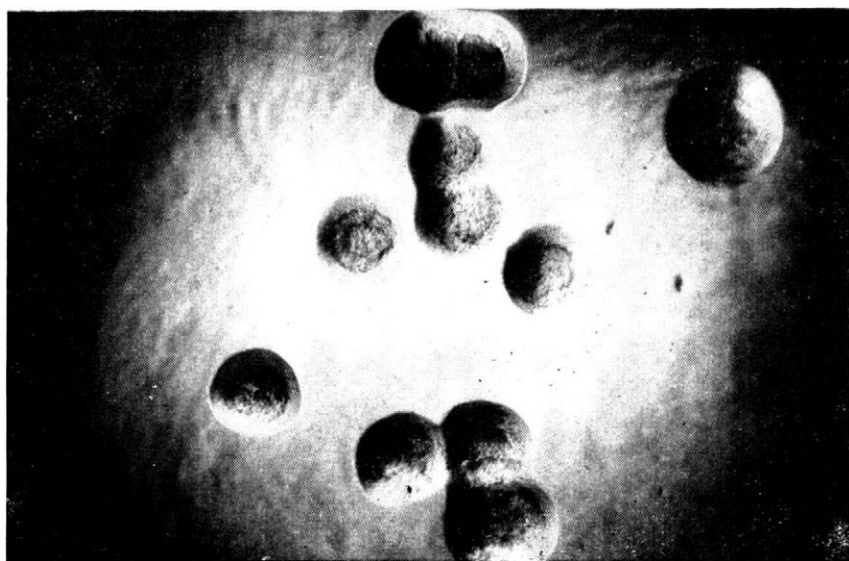
7. Plně rozvinutá velká L-kolonie za 60 hod. po subkultivaci. Fázový kontrast, zvětš. 150×



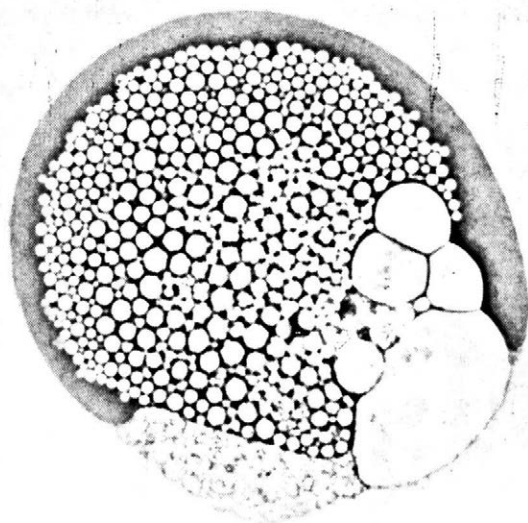
8. Rozvinutá velká L-kolonie se sekundárními centry; 70 hod. po subkultivaci. Fázový kontrast, zvětš. 150×



9. L-kolonie menších rozměrů vyrostlé za aerobních podmínek na Petriho misce; 60 hod. po kultivaci. Zvětš. 50X



10. Velké L-kolonie vyrostlé aerobně na Petriho misce za 60 hod. Zvětš. 400X



Obr. 11. Rozvinuté gigantické tělísko bez tendence k rozvoji v L-kolonii. Fázový kontrast, zvětšeno 400 ×

bilizace L-kolonií u červenkových zárodků. Zatím co Lederberg docílil stabilizovaného růstu jen na půdách s penicilínem, stabilizovaly v našich pokusech L-kolonie již tak, že při jejich první subkultivaci vyrůstaly i na půdách bez penicilínu.

Abychom vyloučili možný účinek přenesených stop penicilínu spolu se suspenzí L-kolonií, ředili jsme značně suspenzi L-kolonií fyziologickým roztokem. Ani při tomto způsobu jsme nepozorovali jejich reverzi. Ojedinělý případ, kdy jsme při pasáži L-kolonií kmene ER 29 docílili jen růstu kolonií složených z normálních tyčinek si vysvětlujeme tím, že na půdě zůstaly pravděpodobně ojedinělé zárodky nedotčené penicilínem, které jeho účinek přežily a daly po překultivaci vznik novým koloniím. Možný je i takový výklad, že některá kolonie již začala ve své primokultuře revertovat a že jsme tyto sekundární tyčinky při pasážování přenesli.

Dosažením stabilního růstu L-kolonií bez tendence k reverzi i na půdách bez penicilínu po 30, 40 a 50 pasážích, splňuje požadavek Klienebergerové-Nobelové o postulátu pro správné označení L-cyklu.

Poměrně snadnou stabilizaci červenkových L-kolonií lze snad vysvětlit morfologickou pružností tohoto mikroorganismu.

Konfrontací vlastních výsledků s literárními údaji domníváme se, v rozporu s T u l a s n e m, že pravý L-cyklus i stabilizaci L-kolonií lze dosáhnout u velkého počtu mikroorganismů. Rozhodující však pravděpodobně je použití vhodné metody jak pro vyvolání cyklu tak i pro jeho stabilizaci.

Souhrn

V předložené práci popisujeme dosažení stabilizovaného růstu L-forem z červenkových kmenů, jejichž vznik jsme vyvolali na agarových půdách s inaktivovaným koňským sérem a penicilínem v množství 0,1 m. j./1 ml živné půdy.

Popisujeme vznik a rozvoj L-kolonie, který je zachycen na mikrofotografiích a diferencujeme tři růstové typy stabilizovaných L-kolonií.

Stabilizace L-kolonií červenkových kmenů byla velmi snadno dosažitelná. Po vzniku L-kolonií z červenkových tyčinek jsme, až na ojedinělou výjimku, dosahovali jejich pravidelného růstu již při první subkultivaci na půdách bez penicilínu i s jeho vysokým obsahem.

L-kolonie všech 7 kmenů vyrůstají velmi dobře na sérových agarech bez penicilínu i s penicilínem ve všech prováděných pasážích.

Jejich růst je stejně dobrý jak za anaerobních podmínek na agarovém bloku, tak i při aerobní kultivaci na Petriho misce. Kolonie vyrůstají od 6–8 pasáží již za 24 hod.

Dva kmeny L-forem jsou v 50., tři v 40. a tři v 30. pasáži, vždy na půdě bez penicilínu a na agarech s penicilínem 1000 m. j./1 ml. Vyrůstají bez jakýchkoliv změn i při zkrácených pasážích na 1. množství penicilínu.

Pasáže na půdách s penicilínem i bez penicilínu nejvíce tendenci k reverzi ve výchozí bakteriální formy.

Literatura

1. Gilmore E., Burnett G. W.: J. Bact., 77, 1959. — 2. Kandler O., Kandler G.: Zeitschrift Naturforschung 11b., 1956. — 3. Klieneberger-Nobel E.: Nature, 179, 1957. — 4. Klieneberger-Nobel E.: Zbl. Bakt. Paras.

Inf. Hyg., ref. 169, 1959. — 5. Lavillaureix J.: C. R. Acad. Sci. 18, 1954. — 6. Lederberg J., St. Clair J.: J. Bact. 75, 1958. — 7. Nermut M.: Babáková sbírka, sv. 14, 1960. — 8. Rada B.: Čs. mikr., 4, 1958. — 9. Silberstein J. K.: Schw. Z. f. allg. Path. u. Bakt., 16, 1953. — 10. Skalka B.: Sborník ČSAZV, Vet. Med., 5. (XXXIII) 1960. — 11. Tulasne R., Lavillaureix J.: C. R. Soc. Biol., 147, 1954. — 12. Ward J. R., Madoff S., Dienes L.: Pric. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 1958.

Стабилизация Л-форм *Erysipelothrix rhusiopathiae*

Автор сообщает о достижении стабилизированного роста Л-форм из штаммов рожи свиней, которые выращивались на агаре с инактивированной лошадиной сывороткой и пенициллином в количестве 0,1 м. е./1 мл питательной среды.

Описано возникновение и развитие Л-колоний, которые изображены на микрофотографиях. Можно различить три ростовых типа стабилизированных колоний.

Стабилизация Л-колоний штаммов рожи не представляла затруднений. Получив Л-колонии из палочек рожи, автор достигал, за исключением единичных случаев, их правильного роста уже при первом субкультивировании на питательных средах без пенициллина, а также на средах, содержащих пенициллин в большом количестве.

Л-колонии всех 7 штаммов хорошо вырастают на сывороточном агаре без пенициллина и с пенициллином при всех проводимых пассажах.

Их рост проходит одинаково хорошо как при анаэробных условиях с применением обыкновенной методики, так и при аэробном культивировании в чашках Петри. Начиная с 6—8 пассажа, колонии вырастают уже через 24 часа.

Два штамма Л-форм проходят в настоящее время 50-ый, три — 40-ой и три — 30-ый пассаж каждый раз на агаре без пенициллина и на агаре, содержащем пенициллин в количестве 1000 м. е./1 мл. При росте не происходит никаких изменений, даже и на агаре с различным количеством пенициллина.

Пассажи на питательных средах с пенициллином и без него не проявляют тенденции к реверсии в исходные бактериальные формы.

Stabilization of L-forms of *Erysipelothrix rhusiopathiae*

In the paper the author describes the stabilization in the growth of L-forms from *Erysipelothrix* strains produced by penicillin in an amount of 0.1 unit per 1 ml of the medium, in agar containing inactivated horse serum.

The formation and development of a L-colony, as illustrated in a series of microphotographs, are described and 3 growth types of stabilized L-colonies differentiated.

The stabilization of the L-colonies of *Erysipelothrix* strains was reached very easily. After the formation of the L-colonies from *Erysipelothrix* rods their regular growth, with the exception of a single case, was already attained with the first subcultivation in the media, both in those without penicillin as well as with its high content.

The L-colonies of all 7 strains grow very well in the serum agars, both without and with penicillin, in all the passages done.

Their growth is equally good, whether they are grown under anaerobic conditions in the agar block or cultivated under aerobic conditions in the Petri dish. From the 6th to 8th passage the colonies grow as early as within 24 hours.

Two strains of the L-forms are in the 50th, three in the 40th, and three in the 30th passage, always in the medium without penicillin and in the agars with 1000 penicillin units per 1 ml. They develop without any changes even with cross passages in the agars having different penicillin amounts.

The passages in the media, both with and without penicillin, do not show any tendency to revert into the initial bacterial forms.

Hodnoty nativního komplementu v krevním séru klinicky zdravých psů

Величины природного комплемента в кровяной сыворотке клинически здоровых собак

Werte des nativen Komplementes im Blutserum klinisch gesunder Hunde

The Value of native Complement in the Blood Serum of clinically healthy Dogs

MVDr. František LEHKÝ

Technická spolupráce Zora ONDRÁČKOVÁ

Veterinární výzkumné středisko Praha

Došlo dne 24. IX. 1960

Ú v o d

Komplement, jako soubor látek různé chemické povahy, skládající se více jak ze 4 částí (C'_1 , C'_2 , C'_3 a C'_4), je obsažen v krevním séru různých zvířat v nestejném množství. (1, 2)

Jeho široké využití v sérologii, kde jako komplex látek vstupuje do vazby antigen + protilátka, ještě rozšiřuje význam, jaký má pro obranné pochody v živém organismu.

Nativní komplement představuje obranné zařízení organismu nespecifického charakteru, které umožňuje činnost řady jiných obranných systémů. Svojí složkou C'_3 usměrňuje činnost properdinového systému, který se účastní aktivně obranných dějů. Množství komplementu (C') je závislé na funkci jater, kde je předpokládán místo hlavní tvorby komplementu. Avšak i adenektomie, např. u králíků, může způsobit pokles hladiny komplementu. Poněvadž v průběhu ročních období hladina komplementu v krvi mírně kolísá, lze předpokládat, že snížený přísun vitamínu C má i za následek snížení hladiny komplementu. (1, 3, 4)

Při studiu otázek souvisejících se serologickou diagnostikou infekčních chorob psů pozorovali jsme kolísání hladiny nativního komplementu v krevním séru pokusných zvířat. Vedle vlivu experimentální infekce mohli jsme sledovat vliv nespecifické zátěže na komplement jako je záření (5), kortizon a p.

Zaměřili jsme se proto na zjištění normálních hodnot hladiny komplementu u klinicky zdravých psů, případně i individuální změny aktivity komplementu během určitého časového úseku.

Metodika

Ke zjištění průměrného titru aktivního komplementu v séru zdravých psů použili jsme vzorky sér 195 psů jednoho speciálního zařízení pro výcvik psů. Psi byli v dobrém výživném stavu, chováni v nejvhodnějších podmínkách, plemene německý vlčák, stáří průměrně $1\frac{1}{2}$ –2 roky.

Odebrané vzorky krve byly ihned zpracovány v naší pojižděné laboratoři, což umožnilo, že byly dodrženy stejné podmínky pro všechna séra, takže narušení nativního komplementu teplem a dobou uplynulou od odběru k vyšetření bylo pro všechny vzorky séra stejné a získané hodnoty za uvedených podmínek možno pokládati za normální.

Způsob titrace minimální hemolytické jednotky komplementu v séru psů jsme přizpůsobili titraci morčecího komplementu tak, jak ji provádíme jako předpokus ke komplement-fixační reakci s tím rozdílem, že při titraci MHD morčecího komplementu ředění odstupňujeme po 0,5 %, u psiho pro nižší účinnost po 1 % (6, 7). Ředění vyšetřovaného séra byla přizpůsobena poměrně nízkému účinku psiho komplementu ve srovnání s komplementem morčecím (přibližně třikrát účinnějším).

Krev po odebrání byla ponechána ve zkumavce při teplotě laboratoře po 30 minut. Po této době byl krevní koláč uvolněn od stěny zkumavky skleněnou tyčinkou a zkumavky ve stojancích dány na dobu 1 hodiny do chladničky při $+4^{\circ}\text{C}$. Pak byla séra odstředěna (3500 obrátek/min.) 10 minut, stažena Pasteurovou pipetou a znovu vychlazena při $+4^{\circ}\text{C}$ po 30 minut. Ředění séra bylo připraveno v poměru 1 + 4, tj. 1,5 ml séra + 6,0 ml FR (s Mg + Ca) = 20 %. Z toho byla připravena další ředění podle schématu:

Výsledné ředění v %	3%	4%	5%	6%	7%	8%	9%	10%	11%	12%	13%	14%	16%	18%
20% sérum	0,15	0,2	0,25	0,3	0,35	0,4	0,45	0,5	0,55	0,6	0,65	0,7	0,8	0,9
FR	0,85	0,8	0,75	0,7	0,65	0,6	0,55	0,5	0,45	0,4	0,35	0,3	0,2	0,1

Vlastní titrace byla prováděna na deskách z plexiskla s vyhloubenými důlky. (8) Z každého ředění jsme přenesli kapku do příslušného důlku na desce a doplnili 2 kapkami FR na objem, ve kterém běžně provádíme komplement fixační reakci. Poté jsme ihned přidali 2 kapky hemolytického systému. Beranní krvinky užívali jsme přibližně 4 % (pro první vyšetření stanovena densita empiricky, nadále byla tato určována fotometricky). Sensibilizace beranních krvinek hemolysinem byla rovněž vždy přesně dodržována a byl to desetinásobek titru odečteného za 30 minut při 37°C za malého nadbytku komplementu. Záměrně bylo používáno hypersensibilizace beranních krvinek, aby byl přehlušen vliv eventuálně přítomného nativního hemolysinu proti beranním krvinkám. Titr komplementu ve vyšetřovaném séru byl odečítán po 1 hodinovém uložení desek v termostatu při 37°C . Dodržováním této metodiky byly hodnoty všech složek reakce vždy stejné, jediná proměnná bylo vyšetřované sérum. Vzhledem k tomu, že pracovní postup byl stejný jako při titraci komplementu pro KFR, byly titry morčecího i psiho komplementu srovnatelné.

Účinnost komplementu jsme stanovili a vyjadřovali nejvyšším ředěním séra v procentech (přičemž 100 % je sérum neředěné), v němž ještě dochází k úplnému rozpuštění přidaných beranních krvinek.

V ý s l e d k y

Nejvyšší zjištěná aktivita byla v séru ředěném 1 : 20 (tj. 5 %), kdy v jednom případě došlo k úplné hemolyze, nejnižší v zředění 1 : 8. U 10 sér ze 195 byl

komplement prokázán jen v neřaděném séru, a to ještě velmi slabé účinnosti. Tato séra, protože jejich hodnota účinnosti C' byla menší než průměrná hodnota minus trojnásobek směrodatné odchylky nepatří do souboru charakterizovaného stanoveným průměrem a nebyla proto dále hodnocena.

Podle dřívějších zkušeností byl komplement určován ředěním v řadě stoupající koncentrace po 1 %, a to od 3%ního ředění výše. Interval 1 % užili jsme jako jednotku měření. Nejvíce případů se nám nahromadilo při ředění sér 9 % (52 případů) a odtud aktivita klesá na obě strany (viz tabulka I a graf). Hodnota 9 % tvoří střed výběru a je možné ji užít jako pomocnou hodnotu a průměr stanovit podle vzorce

$$m = \frac{1}{n} \sum (x_1 - C) + C,$$

přičemž n = počet případů

C = pomocná hodnota 9.

Tabulka ukazuje přehledně nejvyšší ředění, v kterých byly úplně rozpuštěny přidané senzibilizované krvinky:

I.

Ředění séra v %	Počet případů	$(x_1 - C)$	$(x_1 - C)^2$	Počet případů v %
5	1	51	2601	0,51
6	10	42	1764	5,12
7	16	36	1296	8,2
8	21	36	961	10,77
9	52	C	C	26,66
10	29	-23	592	14,87
11	1	-31	961	10,77
12	25	-27	729	12,85
13	10	-42	1764	5,12
Komplement neprokázán		nehodnoceno		5,12

Průměrná hodnota jednotky nativního komplementu v séru zdravých psů je ředění $9,2 \% \pm 0,68$.

Směrodatná odchylka počítaná podle vzorce

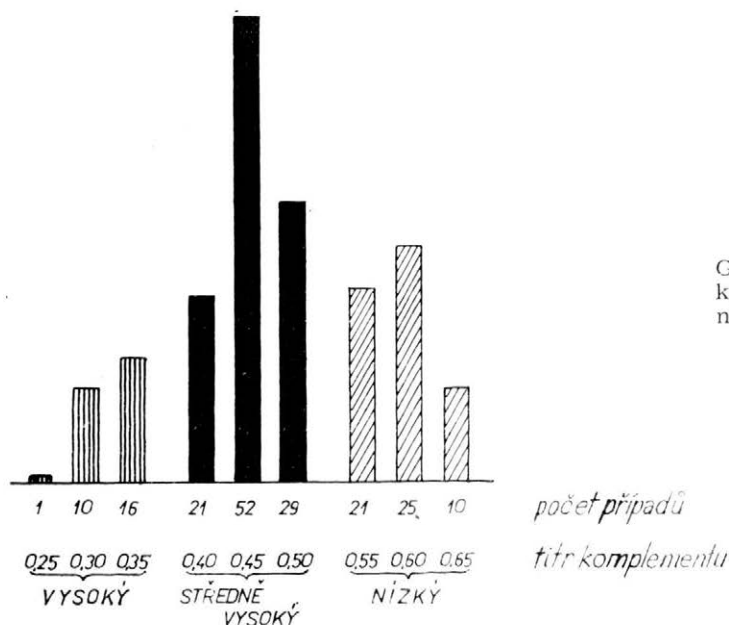
$$S_o = \sqrt{\frac{1}{n} \sum (x_1 - C)^2 - (m - C)^2}$$

je $7,56 \pm 0,55$ a ukazuje, že hodnota minimální hemolytické jednotky komplementu jednotlivých sér je široce rozložena kolem průměru a že aktivita komplementu v jednotlivých sérech kolísá v širokých mezích ředění sér (od 1 : 20 až 1 : 5).

Změny individuální aktivity komplementu u zdravých jedinců jsme sledovali na skupině klinicky zdravých psů po dobu téměř 3 měsíců. Komplement byl sledován dvakrát týdně. Během této doby určité kolísání bylo patrné, ale i zde průměrná hodnota během sledovaného období byla 9,25 % se směrodatnou odchylkou 2,7. Všechny hodnoty byly celkem ve shodě s hodnotou zjištěnou u souboru 195 psů.

Ve společné práci s dr. Pospíšilem „Vliv pronikavého záření na hladinu nativního komplementu v krevním séru ozářených psů ve vztahu k odolnosti vůči

pokusné infekci“ zabývali jsme se otázkou změn komplementu u psů exponovaných rtg paprsky, u nichž docházelo k charakteristickým změnám hodnot titru nativního komplementu, zvláště během 48 hodin po ozáření. (5). Zjištěné hodnoty nativního komplementu v krevním séru klinicky zdravých psů vzali jsme za základ citované studie.



Graf 1. Obsah nativního komplementu v séru klinicky zdravých psů (vyšetřeno 185 psů)

Souhrn

1. Běžnou metodou byla titrována minimální hemolytická jednotka nativního komplementu v krevním séru psů a vypočtena průměrná hodnota jednotky aktivity komplementu klinicky zdravých psů.

2. Průměrná hodnota minimální hemolytické jednotky nativního komplementu byla stanovena vyšetřením 195 vzorků krve psů a odpovídá $9,2 \% \pm 0,68$ ředění séra.

3. Změny individuální aktivity komplementu zdravých jedinců sledovaných po dobu 3 měsíců v pravidelných intervalech (dvakrát týdně) vykazovaly sice mírné kolísání, hodnoty se však udržovaly v mezích hodnot zjištěných u vyšetřeného souboru 195 psů.

4. Zjištěné výsledky představují „normální hodnoty“ komplementu jako indikátorového systému pro řadu studovaných imunologických pochodů v těle psa, který se v poslední době stal opět velmi vyhledávaným pokusným zvířetem.

Literatura

1. Wagner Vl.: Základy imunologie. SZN Praha, 1959. — 2. Hökl J. - Prokúpek K.: Časopis čs. veterinářů 1, 74, 1946. — 3. Morison J. F.: Immunology 7, 435, 1922. — 4. Wassermann J.: Immunology 40, 281, 1940. — 5. Lehký F. - Pospíšil J.: Vliv pronikavého záření na hladinu nativního komplementu

v krevním séru ozářených psů ve vztahu k odolnosti vůči pokusné infekci. V tisku. — 6. Török J. - Szemere G.: Ann. paediat. Basel 192 (4) 296, 1959. — 7. Walton K. W. - Ellis H. A.: Immunology 2, 224, 1958. — 8. Potoček M.: Sborník ČSAZV, Vet. Med. 2 (XXX) 359, 1957.

Величины природного комплемента в кровяной сыворотке клинически здоровых собак

1. Минимальная гемолитическая единица природного комплемента в кровяной сыворотке собак была титрована обычным методом; была также вычислена средняя величина единицы активности комплемента клинически здоровых собак.

2. Средняя величина минимальной гемолитической единицы природного комплемента была определена путем исследования 195 проб крови собак и соответствует $9,2\% \pm 0,68$ разбавленной сыворотки.

3. Изменения индивидуальной активности комплемента здоровых особей, изучаемых в течение 3 месяцев в регулярных интервалах (два раза в неделю), хотя и характеризовались умеренным колебанием, однако ее величины удерживались в пределах величин, установленных у исследуемой группы в 195 собак.

4. Установленные результаты представляют «нормальные величины» комплемента как индикаторной системы для целого ряда изучаемых иммунологических процессов в теле собаки, которая в последнее время снова стала самым распространенным видом подопытного животного.

Werte des nativen Komplementes im Blutserum klinisch gesunder Hunde

1. Man titrierte mittels der üblichen Methode eine minimale hämolytische Einheit des nativen Komplementes im Blutserum der Hunde und errechnete den Durchschnittswert der Aktivitäteneinheit des Komplementes klinisch gesunder Hunde.

2. Der Durchschnittswert der minimalen hämolytischen Einheit des nativen Komplementes wurde durch Untersuchung von 195 Blutproben von Hunden festgestellt und entspricht einer $9,2\% \pm 0,68$ Serumverdünnung.

3. Die Veränderungen der individuellen Aktivität des Komplementes der während 3 Monaten in regelmäßigen Intervallen (zweimal wöchentlich) beobachteten gesunden Individuen wiesen zwar eine leichte Schwankung auf; die Werte bewegten sich jedoch in Grenzen, die bei einer Gruppe von 195 Hunden festgestellt wurden.

4. Die festgestellten Werte repräsentieren „Normalwerte“ des Komplementes als eines Indikatorensystems für eine Reihe von studierten immunologischen Vorgängen im Körper des Hundes, der in der letzten Zeit wiederum als Versuchstier bevorzugt wird.

The Value of native Complement in the Blood Serum of clinically healthy Dogs

1. By the usual method the minimal hemolytic unit of native complement in the blood serum of dogs was titrated and the average value of the activity unit of complement in clinically healthy dogs was calculated.

2. The average value of the minimal hemolytic unit of native complement was established by the examination of 195 samples of blood from dogs and is corresponding to $9,2\% \pm 0,68$ of the serum dilution.

3. The changes of individual activity of the complement in healthy individuals, followed up during 3 months in regular intervals (twice a week), showed indeed a slight variability, but the value remained between the limits found in examining the 195 dogs.

4. The results gained represent the "normal value" of the complement as an indicator system for a series of immunologic processes, studied on the dog, which lately is becoming a very desired animal for experiments.

Enzymatický rozbor ejakulátů býků s nízkou plodností

Энзиматический анализ эякулятов быков с низкой плодovitostí

Die enzymatische Analyse von Ejakulaten von Bullen mit geringer Fruchtbarkeit

MVDr. Lubomír ŠLESINGR

Interní odd. Krajské veterinární nemocnice v Senici n. Myj.

Došlo dne 6. IV. 1960

Úvod

Intenzivní využívání vysoce vyšlechtěných domácích zvířat se může za určitých dosud neprobádaných okolností projevit postupně klesajícími výsledky v produktivitě. Takové klesající tendence dojmé užítkovosti jsou např. známé u vysoce produktivního skotu. Podobné výsledky jsme zaznamenali i u skupiny býků s původní vysokou plodností, která se bez známých příčin postupně během několika roků stále snižovala. Pozorování plemeníci byli ve věku 5—9 roků a jejich životní podmínky tj. ustájení, ošetřování a výživa se nezměnily. Příčiny snížené plodnosti se strany matky byly vyloučeny. Klinicky nejevili plemeníci nejmenších úchylek od zdravotního stavu.

Vzhledem k negativnímu morfologickému nálezu na pohlavním aparátě býků, vitalitě a morfologii spermií, jsme se rozhodli zpracovat ejakuláty plemeníků po stránce enzymatické. Výsledky aktivit enzymů předkládáme v této práci.

Při studiu literatury jsme byli v příslušném oboru odkázáni pouze na několik citací. King a Mann (3) zjišťovali sorbitol-dehydrogenázu ve spermiích beranů. Připravený roztok enzymu z beraních spermií katalyzoval reakci sorbitol + DPN na fruktózu a DPNH. Ullner a Schmitz (14) určovali fruktózu ve 113 vzorcích ejakulátů od 30 různých býků. Množství fruktózy se pohybovalo od 72 mg% do 984 mg%. Byl-li objem ejakulátu větší než 4 ml, vážila fruktóza průměrně 549 mg%. Byl-li objem pod 1,5 ml, dosahovala 495 mg%. Přesahoval-li počet spermií v mm³ 1 mil., byla fruktóza 437 mg%. Klesl-li pod 500 000, byla 565 mg%. Odstupem času se hladina fruktózy snižovala. Ostatní studované práce (6, 8, 9, 15) pojednávají o enzymech nebo fruktóze v krevním séru zvířat nebo seminální plasmě člověka.

Pracovní postup a metodika

Sledovali jsme ve své práci aktivity enzymů: transaminázy kyseliny glutamové oxalacetové GOT, kyseliny glutamové pyrohroznové GPT, aldolázy ALD,

dehydrogenázy kyseliny mléčné LDH, dehydrogenázy kyseliny jablečné MDH, fosfohexoisomerázy PHI a sorbitdehydrogenázy SDH. Dále jsme určovali obsah fruktózy, pH a počet spermií.

Výsledky aktivit citovaných enzymů v ejakulátech býků s nízkou plodností jsme v práci porovnávali se skupinou plemeníků s vysokou plodností. U daných souborů výsledků aktivit enzymů jsme posléze stanovili statistickou významnost.

Charakteristiku uvedených enzymů a metodiku jejich určení jsme popsali v pracích 10, 11, 12, 13. Sorbitdehydrogenázu, kterou jsme sledovali v předložené práci u skupiny málo plodných býků ve srovnání s ejakuláty 4 býků zdravých, jsme určovali metodou podle Ševely a Továrka (9). SDH je charakterizována jako enzym katalyzující zvrtnou reakci mezi D-sorbitolem a oxydovaným difosfopyridin nukleotidem (DPN) za vzniku fruktózy a redukované formy DPNH + H⁺.

Ejakuláty obou skupin byly získány umělou vaginou a paralelně zpracovány po předchozím uložení do ledu. Aktivita enzymů byly určovány z nativních ejakulátů bez předchozí centrifugace. Výsledky enzymů jsou udány v mikromolech 1 ml/1 hod./při 37⁰ C. Fruktóza je udána v mg %.

K fotometrickému měření jsme použili spektrofotometru podle Kouckého a kyvet o průměru 12 mm při 505 milimikronech.

Použili jsme následujícího ředění ejakulátů: pro GOT, LDH, MDH, PHI, SOH a fruktózu 1 : 9, GPT nebylo ředěno, ALD 1 : 49. pH bylo ředěno pomocí roztoku 0,9 % NaCl, který měl pH 6,5.

Hladina fruktózy byla určována metodou podle Roe (16). Ke stanovení pH bylo použito přístroje Kovodružba EK 21 se skleněnou elektrodou.

Počet spermií byl stanoven v Bürkerově komůrce.

V ý s l e d k y

K vyjádření signifikance obou souborů jsme použili statistické významnosti. Pro značnou rozdílnost Σ u GPT, MDH a PHI byla významnost zpřesněna vypočítáním korekce (c).

I. Enzymatické vyšetření ejakulátů plemeníků s nízkou plodností

Jméno	GOT	GPT	ALD	PHI	SDH	LDH	MDH	Fruktóza mg%	PH	Počet spermií v 1 mm ³
Š 24	0,6	1,0	26	220	0,01	16	1,45	40	7,2	1,010.000
C 460	5,0	0,53	23	225	1,12	26	8,6	270	6,4	830.000
C 180	3,65	0,4	60	225	0,45	60	13,0	90	5,9	1,030.000
Š 94	4,3	0,85	75	250	0,06	44	11,5	0	6,1	780.000
C 339	4,3	0,46	45	200	0,9	22	7,5	1.250	6,0	940.000
Š 69	5,7	0,45	70	210	0,1	44	9,0	80	5,8	1,710.000
Š 26	4,65	0,65	42,5	205	0,95	38	9,0	300	5,7	880.000
Š 25	6,3	0,8	60	250	0,1	30	5,3	420	5,8	1,170.000
Š 58	4,3	0,5	65	190	0,0	34	8,0	105	5,9	1,230.000
C 560	3,3	0,65	29	200	1,3	24	2,5	1.200	6,3	580.000
Průměrné hodnoty	4,1	0,62	49,5	217	0,49	33,8	7,5	375	6,1	

II. Plemeníci s nízkou plodností. Průměrná roční plodnost

Jméno	Stáří	1955		1956		1957		1958	
		Počet insemin.	Průměrná plodnost v %	Počet insemin.	Průměrná plodnost v %	Počet insemin.	Průměrná plodnost v %	Počet insemin.	Průměrná plodnost v %
Š. 24	9 r.	558	69,5	464	55	384	45,5	390	44,8
D. 1	9 r.	529	49,7	467	51,1	426	49,9	512	49,1
M. 124	8 r.	688	64,1	552	47,2	400	54,5	591	50,0
R. 3	8 r.	493	44,4	443	42,8	457	51,1	483	43,2
C. 399	5 r.	210	65,7	947	59,1	779	50,3	837	49,8
Mj. 194	6 r.	246	52,0	546	49,8	542	51,7	549	50,2
P. 64	5 r.	172	44,7	546	49,8	510	44,9	521	43,7
Š 27	3 r.	Plodnost není dosud zjištěna							
Š. 58	5 r.	129	64,4	565	62,6	707	48,9	533	47,8
C. 560	3 r.							579	42,3

III. Enzymatické vyšetření ejakulátů zdravých plemeníků

Jméno	GOT	GPT	ALD	PHI	LDH	MDH	Fruktóza mg %	pH	Počet spermií v 1 mm ³
Pr. 42	11	0,2	55	130	30	27	80	5,95	1,340.000
D. 2	9	0,2	20	75	41	36	575	6,6	580.000
D. 3	10	0,2	25	60	31	28	925	6,8	1,220.000
M. 194	8	0,4	30	180	22	18	250	5,9	1,090.000
Pr. 85	11	0,2	45	110	28	36	620	6,1	950.000
Ju. 33	8	0,4	38	90	34	22	300	6,0	1,080.000
Al. 31	7	0,2	45	77	37	27	200	6,05	1,870.000
Al. 32	9	0,1	47	75	22	18	640	6,1	1,180.000
Mj. 235	10	0,3	56	70	40	45	490	6,3	2,140.000
D. 1	9,5	0,2	24	73	26,5	32,8	145	7,02	970.000
Průměrné hodnoty	9,25	0,24	38,5	95	31,1	29	442	6,3	

Tabulky I a III porovnávají názorně aktivity naměřených enzymů. Tabulky II a IV udávají přehled plodnosti obou srovnávaných skupin plemeníků.

Diskuse

Plodnost šetřených býků v tab. II je za stejných podmínek průměrně o 20,9 % nižší nežli je tomu u skupiny seřazené v tab. IV, kde průměrná plodnost přesahuje 63 %.

IV. Průměrná roční plodnost zdravých plemeníků

Jméno	Stáří	% plodnosti po 1. inseminaci	Počet osemeněných krav
Pr. 42	8 r.	67,0	521
D. 2	4 r.	66,3	487
D. 3	4 r.	62	387
M. 194	7 r.	57,9	411
Pr. 85	3 r.	64,9	166
J. 33	6 r.	64,8	508
Al. 31	4 r.	61,9	702
Al. 32	4 r.	60,9	508
Mj. 235	4 r.	63,6	804
D. 1	9 r.	67,8	689

V. Sorbitdehydrogenáza v ejakulátu zdravých býků

Označení býka	Číslo odběru	SDH v mikromolech
N-6	129	1,5
Mž-4	290	0,2
N-5	127	0,7
Tm	147	0,5

Při porovnání enzymatických výsledků obou skupin býků jsme zaznamenali převážně odchylky v transaminázách GOT a GPT. Aktivita transaminázy GOT byla u plemeníků s nízkou plodností v průměru více než dvakrát nižší, kdežto transamináza GPT u skupiny s nízkou plodností byla naopak více než dvakrát vyšší. Normální naměřené hodnoty pro GOT se pohybují mezi 7 až 11 mikromoly, u GPT v rozmezí 0,1 až 0,4 mikromolu. Značně

zvýšená byla rovněž u plemeníků s nízkou plodností PHI (217 mikromolu). Normální hodnoty se pohybují od 73 do 180 mikromolů. Čtyřikrát nižší aktivitu u plemeníků s nízkou plodností jsme naměřili u MDH. Aktivita tohoto enzymu se pohybuje v ejakulátu zdravých býků v rozmezí 18 až 45 mikromolů. Ostatní aktivity enzymatické vykazaly pouze nepatrné úchyly.

Příliš rozdílné výkyvy jsme zaznamenali u fruktózy obou sledovaných skupin plemeníků. U býků s nízkou plodností bylo rozpětí fruktózy od 0 do 1250 mg %, kdežto u býků zdravých pouze v mezích 80 až 925 mg %. U obou skupin si celkem odpovídaly hodnoty pH. Počet spermií byl v průměru nižší u plemeníků s nízkou plodností. Na základě našich výsledků nemůžeme potvrdit vliv množství spermií na aktivity enzymů, jak by se snad dalo předpokládat u SDH v práci Kinga a Manna (3).

VI. Výsledky statistických hodnot

Enzým	N	Σ	Statistické hodnoty	Významnost rozdílů
GOT	Z ₉	1,183	T = 8,05 P < 0,1 %	+++
	N ₉	1,536		
GPT	Z ₉	0,0237	T = 20 P < 0,1 %	++++
	N ₉	0,06		
ALD	Z ₉	11,88	T = 1,35 P > 5 %	±
	N ₉	16,0		
LDH	Z ₉	6,64	T = 1,78 P > 5 %	+
	N ₉	1,183		
MDH	Z ₉	90	T = 0,61 P > 50 %	0
	N ₉	12,90		
PHI	Z ₉	332	T = 1,09 P > 5 %	±
	N ₉	18,75		
SDH	Z ₄	0,55	T = 2,3 P < 5 %	++
	N ₉	0,241		

N Stupeň volnosti souborů

T nalezená výslednice stupně volnosti

P stupeň významnosti

Σ směrodatná odchylka

Labilita obsahu fruktózy v ejakulátech je v písemnictví známá a její rozdílné hodnoty se připisují kapacitě akcesorních žláz pohlavního aparátu (5).

Na základě statistické významnosti, které jsme použili pro zpřesnění výsledků aktivit nízkého počtu sledovaných býků, se průměry transamináz GOT a GPT v obou souborech význačně liší s pravděpodobností menší než 0,1 %. (GOT T = 8,05 P < 0,1 %), (GPT T = 20 P < 0,1 %). U SDH se průměry obou souborů liší s pravděpodobností menší než 5 %. Ostatní sledované aktivity enzymů nejsou statisticky významné. Významnost rozdílů viz v tab. VI.

Ze základů výsledků statistické významnosti zmíněných enzymů vyplývá praktické využití jejich aktivit u případů již v preprodromálním stadiu, kdy klinické ani morfologické změny nejsou ještě patrné.

Z důvodů hospodárných jsme si nemohli dovolit současnou kontrolu histologickou.

Souhrn

Při studiu aktivity enzymů GOT, GPT, ALD, MDH, LDH, PHI, SDH, dále pH a fruktózy v ejakulátech plemenů s vysokou a nízkou plodností, byla stanovena rozdílnost aktivit enzymů s výraznou statistickou významností pro transaminázy kyseliny glutamové oxalocetové a transaminázy kyseliny glutamové pyrohroznové s pravděpodobností menší než 0,1 %. U sorbit-dehydrogenázy s pravděpodobností menší 5 %.

Na základě výrazných rozdílů v aktivitě GOT a GPT usuzujeme na alteraci fyziologické činnosti pohlavních žláz vyšetřovaných plemeníků, která se projevila klesající schopností oplozovací.

Literatura

1. Gürtler H. et al.: B. u. M. t. W. 2, 27, 1960. — 2. Homolka J.: Chemická diagnostika, Praha 1956. — 3. King E. - Mann T.: Nature 868-9, 1958. — 4. Kozlov P. M.: Zdravotnická statistika, Praha 1952. — 5. Mann T.: Biochemistry of semen, Proceedings of the sec. World Congress on fertility and sterility, Napoli: 18-26, maggio 1956. — 6. Ninger E. - Továrek J.: Cor et Vasa 1, 119-129, 1959. — 7. Polák L.: Inseminace skotu, St. zeměděl. nakl., Praha 1956. — 8. Ševela M.: Vnitřní lékařství 8, 721, 1958. — 9. Ševela M. - Továrek J.: Stanovení SDH, dosud nevyšlo. — 10. Šlesinger L.: Vet. med. 12, 949, 1959. — 11. dtto, Vet. časopis, 6, 583, 1959. — 12. dtto, Vet. časopis, 1959, dosud nevyšlo. — 13. dtto, Vet. med. 1959, dosud nevyšlo. — 14. Ullner W. - Schmitz B.: B. u. M. t. W., 71, 147, 172, 1958. — 15. Vasting T. F.: Fructose and Fructolysis in human seminal fluid. Zschr. f. Geburtsh. u. Gynék., 152, 36-43, 1959.

Энзиматический анализ эякулятов быков с низкой плодовитостью

При изучении активности энзимов GOT, GPT, ALD, MDH, LDH, PHI, SDH далее pH и фруктозы в эякулятах быков-производителей с высокой и низкой плодовитостью было установлено различие активностей энзимов с явной статистической значимостью для трансаминазы глутаминооксауксусной кислоты и трансаминазы глутаминопировиноградной кислоты с вероятностью менее чем 0,1 %. У сорбита дегидрогеназа с вероятностью менее 5 %.

На основе ярко выраженных различий в активности GOT и GPT приходим к заключению альтернции физиологической деятельности половых желез обследуемых быков-производителей, которая проявилась в снижающейся оплодотворяющей способности.

Die enzymatische Analyse von Ejakulaten von Bullen mit geringer Fruchtbarkeit

Beim Studium der Aktivität der Enzyme GOT, GPT, ALD, MDH, LDH, PHI, SDH, ferner von pH und der Fructose im Ejakulat von Bullen mit hoher und niedriger Fruchtbarkeit wurde die verschiedene Aktivität der Enzyme festgestellt bei ausgeprägter Bedeutung der Transaminase der Glutam-Oxalessigsäure und der Transaminase der Glutam-Brenztraubensäure mit einer Wahrscheinlichkeit kleiner als 0,1 %. Bei der Sorbitdehydrogenase mit einer Wahrscheinlichkeit kleiner als 5 %.

Auf Grund dieser ausgeprägten Unterschiede der Aktivität der GOT und GPT schließen wir auf eine Alteration der physiologischen Tätigkeit der Geschlechtsdrüsen der untersuchten Bullen, die sich in sinkender Befruchtungsfähigkeit äußerte.

xikologickou laboratoř výsledek biochemické zkoušky vlastně diagnózou. O druhu organofosfátu a o kvantitativních poměrech při otravě musí pak rozhodnout metoda chemické analýzy. Jiné poměry jsou při klinickém vyšetření, kde mají biochemické metody pro svou jednoduchost primát.

Ke stanovení samotného Schradanu bylo dosud užito různých způsobů, a to jednak v syntetických a komerčních preparátech, jednak v rostlinném materiálu. Tak pro práci s rostlinným materiálem byl vypracován způsob užívající tvorby molybdenové modři (2, 3). Jiní autoři považují metodu vanadofosfomolybdenovou za spolehlivější pro stanovení fosforu (4). Kolorimetrie kovových solí kyseliny dialkyldithiokarbamidové bylo užito k stanovením různého druhu. O kolorimetrii řady kationtů pojednává obsažný referát (5). Sirouhlík určoval tímto způsobem S o u č e k (6). Bylo vypracováno i stanovení dimethylaminu v biologických tektutinách jako dimethyldithiokarbamidán měďnatý (7). Kombinace destilační a kolorimetrické metody bylo užito v práci (8).

P o k u s n á č á s t

1. Použité přístroje a chemikálie

Erlenm. baňky 100 ml NZ 29/32 se zpětným chladičem.

Dělicí nálevky 150 ml.

Odměrné baňky 25, 50, 100 a 250 ml.

Malé skleněné frity S-1.

Olejoval lázeň s regulací teploty a míchadlem.

Kolorimetr Lange-Universal.

Brussels Sytam s 40 % Schradanu.

Roztok obsahující přibližně 0,1 % Schradanu.

Chloroform p. a.

Petroléter (frakce 40—60° C).

Sirouhlík p. a.

1 N H₂SO₄, 0,02 N HCl, 0,02 N NaOH, 0,01 N AgNO₃, 30 % NaOH.

Roztok tetrahydrátu kyselého fosforečnanu sodnoamonného p. a. odpovídající 20 µg OMPA/ml.

Roztok dimethylaminhydrochloridu odpovídající 20 µg OMPA/ml.

Kovový cín.

Molybdenan amonný čistý.

Síran sodný bezvodý.

Měďnaté činidlo: 0,1 g krystalického síranu měďnatého rozpuštěno v 5 ml vody a doplněno do 100 ml konc. amoniakem.

2. Kalibrační křivky

Z hydrolytické rovnice plyne, že z jedné molekuly OMPA vzniknou 4 molekuly soli dimethylaminu a 2 molekuly kyseliny fosforečné.

Standardní roztoky pro změření kalibračních křivek byly připraveny tak, aby odpovídaly 20 µg OMPA/ml.

a) Kalibrační křivka dimethylaminu

Do odměrné baňky 1000 ml bylo naváženo 0,2280 g hydrochloridu dimethylaminu čerstvě překrystalovaného z alkoholu a alkoholéteru. Hodnota základního

roztoku byla zkontrolována jednak titrací 0,02 N NaOH (po destilaci), jednak titrací 0,01 N AgNO₃ a upravena tak, aby roztok odpovídal přesně 200 µg OMPA (227,9 µg hydrochloridu dimethylaminu) v 1 ml. Při obou titracích bylo použito potenciometrického způsobu indikace bodu ekvivalence. Před vlastním zhoovením kalibračních křivek bylo 10 ml základního roztoku doplněno v odměrné baňce 100 ml po značku. Postup při vyvolání zbarvení je uveden v následující kapitole.

b) Kalibrační křivka fosforu

Do odměrné baňky 1000 ml bylo naváženo přesně 0,2915 g tetrahydrátu kyselého fosforečnanu sodno-amonného (odpovídá 200 µg OMPA/ml). Pro zhoovení kalibrační křivky bylo 10 ml tohoto základního roztoku doplněno v odměrné baňce 100 ml po značku.

3. Vlastní pracovní postup

Stanovení OMPA bylo provedeno v obsahu zažívaděl, játrech, moči a exsudátu. Kromě toho i na pokožce, kožešině a chlupích (při potřísnění kontaktní aplikací). Postup při zpracování tekutin je jednodušší.

Vzorek byl trojnásobně extrahován vodou a ve dvou až tříhodinových intervalech kvantitativně liltrován přes velkou fritu nebo přes Büchnerovu nálevku. Spojené vodné extrakty byly vytřepávány 20 ml petroléteru. Vodná vrstva byla odpuštěna do další dělicí nálevky, petroléter vytřepán ještě 10 ml vody a vodná vrstva připojena k hlavnímu podílu. Jestliže se vytvořila na rozhraní pěna, byla vodná vrstva nejprve co možná kvantitativně odpuštěna a pěna odstraněna několika kapkami methanolu. Vodná vrstava, která obsahuje všechny OMPA, byla opatrně protřepávána dvakrát 10–15 ml chloroformu. Chloroform byl vpuštěn do Erlenmayerovy baňky 100 ml, v níž bylo předloženo 20 ml 1N H₂SO₄, byl připojen zpětný chladič a baňka byla ponořena do olejové lázně vyhřáté na 70 až 80°C. Chloroform byl oddestilován (do chladiče se nepustí voda). Je možno též chloroform vyhnat proudem vzduchu. Pak byla do chladiče vpuštěna voda, teplota lázně zvýšena na 110°C. Hydrolýza je skončena za 2 hodiny. Chladič byl vypláchnut malým množstvím vody a hydrolyzát doplněn po značku v odměrné baňce 50, 100 nebo 250 ml (podle očekávaného množství OMPA). Alikvotní podíl (nejlépe odpovídající 20–200 µg Schradanu) byl napipetován do dělicí nálevky 150 ml, přidáno 0,2 ml sirouhlíku, 5 kapek 30%ního NaOH, 1 ml měďnatého činidla a 10 ml chloroformu. Po vytřepání byla chloroformová vrstva odpuštěna přes řídkou fritu, na níž byl navrstven bezvodý síran sodný. Extrakce byla opakována ještě jednou deseti a pak pěti mililitry chloroformu. Extrakty zfiltrované do odměrné baňky 25 ml byly doplněny chloroformem po značku. Žlutohnědě zbarvený roztok dimethyldithiokarbamidanu měďnatého byl proměřován na kolorimetru Lange-Universal při spektrálním filtru s maximální propustností při 435 mµ. Byly použity kyvety obsahu 10 ml uzátkované korkovou zátkou obalenou hliníkovou folií, aby se zamezilo odpařování chloroformu během měření.

Současně byl v jiném alikvotním podílu stanoven fosfor obvyklým způsobem. Kolorimetrie byla provedena na též přístroji s fitrem RG-2.

Pro biologické tekutiny byl celý postup jednodušší tím, že odpadla zdlouhavá a pracovně náročná vodná extrakce. Vzorek byl vhodně zředěn vodou a ihned započato s petroléterovou extrakcí. Další postup je stejný.

4. Experimentální otravy

Účinek organofosfátů na teplokrevná zvířata není doposud spolehlivě vyšetřen. Z literatury (12) je všeobecně známa inhibiční schopnost organofosfátů pro skupinu hydrolytických fermentů, pro cholinesterázu a acetylcholinesterázu. U zvířat dochází ke zvýšení hladiny acetylcholinu v krvi, parenchymatózních orgánech a v centrální nervové soustavě. Dochází ke zvýšené dráždivosti nervu vazu. Experimentální otrava byla provedena u 5 králíků, a to u dvou králíků po kontaktní aplikaci, u tří po aplikaci perorální. K vyvolání otravy bylo použito Schradanu v 0,5–1%ním roztoku jako postřiku na hřbet králíků nebo jako přídávku přímo do krmiva. V jednom případě byl králík otráven trávou, která byla týden před posečením postříkána 1%ním roztokem OMPA.

V následujícím jsou popsány klinické příznaky a pitevní nález, vyskytující se u králíků, které byly vyvolány akutní těžkou otravou při perorální aplikaci.

Klinické příznaky: Po uplynutí 30 minut od podání potravy (kapusty s 20 ml 1%ního roztoku Schradanu) dostavuje se u králíků neklid, který se s postupem času zesiluje a přechází v kolikové bolesti. Králík často uléhá na břicho, přední končetiny jsou nataženy dopředu a do stran, zadní končetiny jsou nataženy směrem dozadu. Projevuje se na nich zvýšený tonus extenzorů. Nastává svědění kůže na místech zasažených organofosfátem, což se klinicky projevuje častým škrabáním a olizováním. Postupně se dostavuje salivace se zvýšenou sekrecí nosní. Frekvence dechu je poněkud zrychlená a srdeční rytmus je zpomalen. Králík je apatický, chůzi má nejistou, vrávoravou, často směrem dozadu. Po uplynutí 45 minut od požití potravy se dostavují záškuby svalstva, které později přecházejí v klonicko-tonické křeče. Auskultací plicního pole je slyšet jasné pískoty a vrzoty. Po uplynutí jedné hodiny králík leží na břiše ve shora popsané poloze, dostavují se těžké břišní bolesti, při nichž králík vydává bolestivé zvuky. V brzké době dochází k exitu v poloze břišní s hlavou poněkud vztyčenou.

Pitevní nález: Oedem plic, parenchymatózní degenerace jater, oedem stěny žaludku v krajině pyloru, akutní katarální zánět střev, oedem centrálního nervstva, krváceniny ve sliznici močového měchýře a tenkého střeva, krev je sražená, barvy tmavočervenohnědé.

Během minulého roku jsme prováděli pitvy uhynulých zajíců z terénu, kde bylo použito Schradanu k tlumení rostlinných škůdců. Pitevní nálezy byly shodné s nálezy, které jsme si ověřili při experimentální otravě králíků. Chemické zkoušky (pouze kvalitativní) byly rovněž pozitivní.

Výsledky analýz experimentálně otrávených králíků jsou uvedeny v tabulce III.

Výsledky a diskuse

Hlavním úkolem práce bylo vybrat nejvhodnější a nejpřesnější metodu kvantitativního určení amidofosfátů, zjistit reprodukovatelnost a interferující vlivy při jejich stanovení jako sekundární amin a dále, má-li i stanovení fosforu analytický význam. Od určení fosforu jsme si původně neslibovali dobré výsledky, pokusy však ukazují, že při uvedeném postupu lze i na toto stanovení brát zřetel.

Řadou pokusů byla ověřena reprodukovatelnost stanovení OMPA jako dimethylaminu a fosforu v připraveném přibližně 0,1%ním roztoku Schradanu. V tabulce I jsou zachyceny poměry při hydrolýze a rozdělování mezi petroléter a vodu

Druh stanovení		Pokus číslo											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Přímá hydrolýza 10 ml 0,1% OMPA	Amin Fosfor	13,15* 10,48	11,20 11,12	11,45 11,14	10,50 11,08	10,95 11,74*	11,25 11,16	11,00 10,47	11,15 10,84	10,70 10,53	10,95 10,61	11,40 11,46	11,10 10,88
Extrakce 1 × 10 ml chloroformu	Amin Fosfor	— —	— —	8,70 8,70	9,22 9,44	— —	9,85 9,67	— —	— —	— —	— —	— —	— —
Extrakce 2 × 10 ml chloroformu	Amin Fosfor	7,85* 8,76*	10,25 9,69	10,55 10,04	11,70* 11,11	9,90 10,61*	10,95 10,84	— —	10,35 10,31	10,05 9,71	10,35 10,12	— —	10,70 10,70
Extrakce 3 × 10 ml chloroformu	Amin Fosfor	9,05* 8,76*	10,15 9,49	10,80 10,64	11,15 11,00	10,55 11,40*	10,85 10,69	— —	— —	— —	— —	10,85 10,72	— —
Extrakce 1 × 10 ml petroléru (hydrolýza vodné vrstvy)	Amin Fosfor	— —	— —	— —	— —	— —	— —	10,45 10,80	10,95 10,72	10,55 10,64	— —	— —	— —
Extrakce 2 × 10 ml petroléru (hydrolýza vodné vrstvy)	Amin Fosfor	— —	— —	— —	— —	— —	— —	10,35 10,69	— —	— —	10,85 10,53	11,20 11,42	11,00 13,60*
Extrakce 2 × 10 ml petroléru a 2 × 10 ml chloroformu	Amin Fosfor	— —	— —	— —	— —	— —	— —	— —	10,15 10,01	10,00 10,10	— —	10,70 10,45	10,45 10,58
Hydrolýza vodné vrstvy extrahované 2 × 10 ml chloroformu	Amin Fosfor	— —	— —	stopy 0	0 0	0,85 1,06	stopy 0	— —	0,65 0,48	stopy stopy	0,55 0,53	0,50 0,50	stopy stopy
Hydrolýza petrolérové vrstvy	Amin Fosfor	— —	— —	— —	— —	— —	— —	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0	0 0

Ke všem stanovením pipetováno 10 ml přibližně 0,1%ního Schradonu.

* ... extrémní hodnoty.

a chloroform a vodu. Z tabulky vyplývá, že dvojnásobná extrakce OMPA chlo-roformem z vodné vrstvy dává prakticky stejné výsledky jako extrakce trojnásobná. Při extrakci petroléterem zůstává OMPA kvantitativně ve vodné vrstvě.

Reprodukovatelnost byla ověřena výpočtem pravděpodobných relativních chyb. Řada pokusů, v nichž byla kolorimetrická měření provedena po přímé hydrolýze 10 ml přibližně 0,1 %ního Schradanu, dává tyto výsledky:

Přesnost jednotlivého stanovení je:

$$x_a = 11,06 \pm 0,19 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 1,7 \% \text{ pro amin a}$$

$$x_p = 10,93 \pm 0,22 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 2,0 \% \text{ pro fosfor.}$$

Přesnost stanovení střední hodnoty je:

$$\bar{x}_a = 11,06 \pm 0,06 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 0,55 \% \text{ pro amin a}$$

$$\bar{x}_p = 10,93 \pm 0,07 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 0,65 \% \text{ pro fosfor.}$$

Další řada vzorků, s nimiž byl proveden celý pracovní postup vykazuje pocho-pitelně větší variabilitu. I zde bylo bráno k práci 10 ml přibližně 0,1 %ního Schradanu. Pro celý pracovní postup je přesnost jednotlivého stanovení:

$$x_a = 10,53 \pm 0,25 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 2,4 \% \text{ pro amin a}$$

$$x_p = 10,39 \pm 0,35 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 3,3 \% \text{ pro fosfor.}$$

Přesnost střední hodnoty je:

$$\bar{x}_a = 10,53 \pm 0,07 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 0,7 \% \text{ pro amin a}$$

$$\bar{x}_p = 10,39 \pm 0,10 \text{ mg OMPA, tj. } \pm 0,95 \% \text{ pro fosfor.}$$

Z uvedeného vyplývá, že při stanovení aminu se dopouštíme menší chyby, že tedy určení OMPA jako dimethylamin je reprodukovatelnější, než určení jako fosforečnanový ion. Rovněž z tabulky je vidět, že musel být vyloučen větší počet hodnot stanovení fosforu jako extrémních. Větší přesnost stanovení dimethylaminu je dána i tím, že při kolorimetrii používáme spektrálního filtru s maximální propustností při 435 m μ . Právě při této hodnotě vykazuje extinkční křivka měď-natého komplexu maximum. Nevýhodou kvantitativního určení OMPA jako fos-foru jsou rovněž zkreslené výsledky vždy tehdy, nedbáme-li úzkostlivě o čistotu použitého skla.

Z porovnání středních hodnot vzorků přímo kolorimetovaných a zpracova-ných úplným postupem plyne, že z biologického materiálu lze získat asi $95,5 \pm 2,9 \%$ OMPA. Dokonalá izolace závisí nejvíce na úplném oddělení chlo-roformové vrstvy.

Tabulka II ukazuje, že z biologického materiálu nejsou běžně izolovány žádné sekundární aminy. Více překvapuje, že i nalezené množství fosforu jsou nejvýše stopová. Lze tedy i hodnotám fosforu připsat analytický význam. To je dáno výhodnými izolačními vlastnostmi OMPA. Je totiž velmi dobře rozpustný ve vodě, dokonale v chloroformu a prakticky nerozpustný v petroléteru. Tak je umožněno oddělit OMPA od anorganických fosfátů i jiných interferujících látek obsahujících fosfor. V tabulce II je rovněž sledována stálost OMPA v obsahu zažívacích ponechaném tři dny při laboratorní teplotě. Ukazuje se, že nalezené hodnoty Schradanu za těchto podmínek jsou asi 70–85 % dodaného množství. Svědčí to pro poměrně značnou stálost tohoto organofosfátu v biologickém ma-teriálu.

Tabulka III uvádí výsledky vyšetření provedených u králíků otrávených růz-nými dávkami OMPA. Vidíme z ní, že není možno použít ke stanovení Schradanu jater a exsudátu, protože nalezená množství jsou malá nebo stopová. S výhodou

lze použít obsahu zaživadel a hlavně moči při perorální aplikaci nebo pokožky či chlupů při kontaktní aplikaci. Nejvýhodnější se nám jeví vyšetření moči. Zde jsou hladiny OMPA nejvyšší a nadto je práce s močí kratší a snazší. Při práci s močí je ovšem nutno zachovávat jistou opatrnost. D o w d e n totiž uvádí (7), že v moči jsou obsažena určitá množství dimethylaminu. Udává, že v lidské moči je 5–6 mg a v moči skotu 20–40 mg dimethylaminického dusíku v jednom litru. Tyto hodnoty byly kontrolovány a došli jsme k dobré shodě v množství nalezeného dimethylaminu s uvedenou citací. Bylo nutno zjistit, zda přítomný sekundární amin neinterferuje při stanovení Schradanu.

Reakce moči je normálně slabě kyselá, dimethylamin je v ní přítomen ve formě soli, která není extrahovatelná do chloroformu. Pracovali jsme úmyslně i s močí, jejíž pH bylo upraveno na 7–9 a zjistili jsme, že ani v těchto vzorcích není stanovení rušeno. S močí jsme pracovali podle odstavce 3. Skutečnost lze vysvětlit dvojím vlivem. Jednak dimethylamin jako slabá báze není při pH = 7 až 9 dostatečně uvolněn ze své soli, jednak i jako volný, je značně rozpustný ve vodě. Je známa skutečnost, že alifatické aminy jsou ve vodě rozpustnější, než odpovídající alkoholy. Je tedy pravděpodobné, že rozdělovací koeficient dimethylaminu mezi chloroform a vodu je malý. Závěrem lze prostě říci, že přítomnost dimethylaminu v moči neruší stanovení OMPA, pracuje-li se podle postupu uvedeného v experimentální části. Jelikož pH moči je variabilní hodnota, doporučujeme u vzorků s vyšším pH upravit aciditu přibližně na hodnotu 5.

Byl zjišťován i význam jiných interferujících vlivů. Tak přítomnost primárních a terciárních aminů neruší. Vliv interference rostlinných barviv je rovněž

II.

Druh zvířete		Vyšetřovaný vzorek										
		obsah zaživadel						moč			chlupy	
Slepice	Amin	0	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
	Fosfor	stopy	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—
Králík	Amin	0	0	—	a 9,25			0	0	0	0	0
	Fosfor	0	0	—	a 9,18			0	0	0	0	0
Sele	Amin	0	0	0	a 7,05	a 8,55	a 8,35	0	0	—	—	—
	Fosfor	stopy	0	0	a 7,46	a 9,24	a 8,86	0	0	—	—	—
Vepř	Amin	0	0	0	—	—		0	—	—	—	—
	Fosfor	0	0	0	—	—		0	—	—	—	—
Jalovice	Amin	0	0	0	—	—		0	0	—	—	—
	Fosfor	stopy	stopy	0	—	—		0	0	—	—	—

Vyšetřované vzorky nebyly váženy.

a ... ke vzorku přidáno 10 ml asi 0,1% niho OMPA, ponecháno 72 hodin při laboratorní teplotě a pak zpracováno. Nalezené hodnoty jsou udány v mg OMPA.

zanedbatelný. Zkoušeli jsme analyzovat obsah živadel králíka krmeného mrkví a zjistili jsme, že ani karoteny neruší stanovení dimethylaminu. Izolují se totiž do petroletherové vrstvy. V případě, že se petroléter při vytřepávání zřetelně barví, doporučujeme extrakci petroléterem zopakovat. Kdyby ani to nepomohlo (i když jsme se s podobným případem nesetkali), zbývá stále ještě možnost dimethylamin oddělit destilací.

K závažným chybám a vyšším výsledkům by vedl styk vzorků během pracovního postupu s gumou. Veškerou práci nutno provádět v zábrusovém skle. Vyšší výsledky by zavinil i zákal jemně rozptýlené vody v chloroformu při kolorimetrii dimethylaminu. Zákal byl odstraněn filtrací přes vrstvu bezvodého síranu sodného. Vyjasnění chloroformu lze však dosíci i přidáním několika kapek alkoholu (9).

Obtíže vznikají, tvoří-li se pěnovitá emulze při vytřepávání vodného extraktu nebo moče chloroformem. Nepodařilo se nám uspokojivě zamezit její tvorbě che-

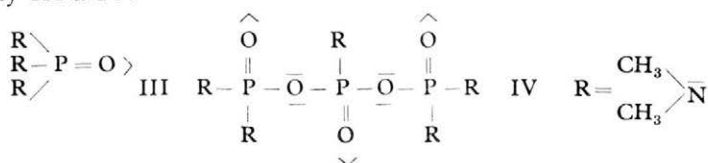
III. Pokus na králících

Pokus číslo	Aplikace	Vzorek	Navážka v g	Nalezeno mg ¹⁰⁰ OMPA	
1	kontaktní	chlupy	10	Amin	3,37
				Fosfor	3,82
2	kontaktní	chlupy	5	Amin	2,49
				Fosfor	2,44
3	<i>per os</i>	obsah živadel	22,0	Amin	2,66
				Fosfor	3,18
		moč	10	Amin	8,06
				Fosfor	8,94
		játra	8,5	Amin	0,46
				Fosfor	0,38
4	<i>per os</i>	obsah živadel	35,7	Amin	4,76
				Fosfor	3,55
		exsudát	3	Amin	0,47
				Fosfor	0
		játra	10	Amin	0,32
				Fosfor	0,45
5	<i>per os</i>	obsah živadel	6	Amin	4,35
				Fosfor	4,51
		moč	20	Amin	9,44
				Fosfor	11,00
		tráva	100	Amin	6,95
				Fosfor	7,23

mickou cestou, a proto musíme doporučit pouze opatrné a mírné vytřepávání. Vznikne-li přesto na rozhraní emulze, nutno vytřepávání opakovat třikrát, abychom dosáhli co možná kvantitativního oddělení OMPA.

Spornou otázkou je stálost mědnaté soli kyseliny dimethyldithiokarbamidové v chloroformu při kolorimetrii. Někteří autoři uvádějí, že je zbarvení stále 30 minut, jiní tvrdí, že nedochází k poklesu intenzity do tří hodin. S posledním údajem se shodují naše zkušenosti. Nutno ovšem upozornit na práci (6), kde se udává, že přídavek triethanolaminu stabilizuje zbarvení na dobu 3–5 dní. Nevíme ovšem, zda se tímto zásahem neporuší platnost Lambert-Beerova zákona (normálně můžeme ředit příliš zbarvené vzorky chloroformem).

Z porovnání tabulek I, II, III je vidět další zajímavá skutečnost. V tabulce I jsou hodnoty OMPA, nalezené na podkladě měření koncentrace fosforu, téměř vždy o málo nižší, než hodnoty nalezené na základě měření koncentrace dimethylaminu. Tento zjev je dán okolností, že přepočítáváme výsledky na čistý Schradan, zatímco obchodní preparáty, s nimiž pracujeme, obsahují další více či méně účinné součásti s jiným ekvivalentovým poměrem aminu a fosforu. Jedná se hlavně o sloučeniny III a IV.



Při přepočítávání tedy zřejmě převažuje vliv sloučeniny III, která obsahuje relativně méně fosforu.

V tabulce II a III jsou však naopak hodnoty OMPA počítané z měření fosforečnanu vyšší. Tuto okolnost by bylo možno vysvětlit dvojím způsobem. Jedná se vždy o vzorky vystavené delšímu působení biologického systému (hlavně žaludečních šťáv). Mohlo by tedy dojít k selektivní hydrolýze jedné složky technického produktu tj. sloučeniny III, IV nebo OMPA. Vzhledem k tomu, že relativní množství fosforu vůči dimethylaminu stouplo (absolutní množství pochopitelně klesá), musela by se nejspíše hydrolýzovat sloučenina III obsahující relativně nejméně fosforu. To je však kineticky nepravděpodobné a potvrzuje to i práce (4), podle níž se v alkalickém prostředí hydrolýzuje nejspíše sloučenina IV.

Druhé vysvětlení je pravděpodobnější. V literatuře se udává (11), že vlastním inhibitorem cholinesterázy není samotný OMPA, ale jeho metabolity zejména sloučeniny, které bychom mohli nazvat N-oxidy. Tím je snad část dimethylaminových skupin trvale metabolicky blokována a jejich relativní analyticky zjistitelné množství klesne. Podobné oxidační produkty vznikají i v rostlinách a i zde byly nalezené hodnoty dimethylaminu nižší, než u paralelního stanovení fosforu.

Rozdíl v těchto nalezených hodnotách by tedy mohl dát obrázek o tom, jak který organismus intenzivně vytváří vlastní toxické agens. Rozdíly ovšem nutno posuzovat opatrně, případ od případu, neboť nemůžeme vždy zabránit izolaci stopových množství fosforu i z „čistého“ materiálu. Tato stopová množství mohou poněkud zvyšovat rozdíly mezi hodnotami fosforu a aminu ve vzorku. *)

Pozn.: Uvedená metoda je selektivní pro skupinu amidofosfátů. Kvantitativní stanovení je prováděno až po předběžných důkazech kvalitativních. Skutečnost, že jde o organofosfát nám ukáže rychlá a jednoduchá zkouška biochemická, např. zkouška Pokrovského. Důkaz sekundárních aminů a fosforu po hydrolýze kvalifikuje pak

Tento příspěvek je druhou částí práce publikované ve Veterinární medicíně č. 12, roč. 1960, str. 913. Autor popisuje svou metodu stanovení amidofosfátů.

Výhodou uvedené metody je to, že je přímá a selektivní. Její pomocí zjišťujeme, nejen že se jedná o otravu organofosfátem, ale organofosfát přímo klasifikujeme, což může mít význam při forensním vyšetření. Metoda dále umožňuje dosáhnout větší přesnosti použitím běžných analytických způsobů, než s jakou lze počítat při kvantitativním stanovení biochemickou cestou. To se zvláště výrazně projeví u skotu, u něhož jsou hladiny cholinesterázy v plasmě značně nízké (1). Nevýhodou metody je větší časová náročnost než u vyšetření biochemických. Velmi uspokojivá je citlivost. Lze pohodlně stanovit 20–40 µg OMPA. Po případných úpravách je možno citlivost ještě i dvojnásobně zvýšit.

Závěrem nutno upozornit, že veškerá práce s podezřelým materiálem se musí provádět opatrně, je nezbytné dodržovat všechna bezprostřední opatření a pracovat v ochranných prostředcích.

organofosfát do skupiny amidofosfátů. Je nutno si uvědomit, že celá řada látek používaných k hubení škůdců (nejen ze skupiny organofosfátů) může uvolnit při hydrolyze sekundární amin.

Teoreticky by přicházela v úvahu celá řada látek jako např. látka DN 111, některé deriváty isosafrolu, fluorethanolu, Cystogon, Isolan, Pyrolan, Castrix, Ziram, Ferbam, Fermasan apod., které nejsou organofosfáty. Některé z jmenovaných látek nejsou přitom vůči teplokrevným živočichům příliš toxické. Všechny jmenované látky neobsahují fosfor a budou se tedy vždy lišit od důkazu amidofosfátů negativním nebo pouze stopovým nálezem fosforu. Většina z nich je dále nerozpustná ve vodě (až na Isolan a Pyrolan) a nebudou tedy při pracovním postupu izolovány. Ziram, u něhož není možno zanedbat rozpustnost ve vodě (65 mg/l při 25°C) lze odlišit negativním důkazem fosforu a důkazem zinku v mikroměřítku. Kromě toho lze odlišit všechny dithiokarbamáty přímou konverzí na měďnatou sůl, bez přídavku sirouhlíku, který je při důkazu samotného sekundárního aminu nutný. Uvedený rozbor je ovšem čistě teoretický, protože z uvedených sloučenin se používá u nás jen malá část.

I ve skupině samotných organofosfátů se vyskytuje řada obchodních přípravků uvolňujících při hydrolyze sekundární amin. Kromě OMPA a jeho analogů přicházejí v úvahu látky obsahující síru-Holcomb, některé esteramidy kyseliny thiofosforečné, některá analoga Systoxu a dále vlastní amidofosfáty-Dimefox a některé látky odvozené od Mipafoxu. I v této skupině lze na základě jednoduchých úvah a zkoušek zvýšit selektivitu stanovení. Organofosfáty obsahující síru nejsou zpravidla rozpustné ve vodě a nejsou tedy ani izolovány. Kromě toho lze prokázat sirovodík unikající při kyselé hydrolyze pohlcením v roztoku octanu zinečnatého a dimethyl-p-fenylendiaminu (vznik methylenové modře). Z uvedených organofosfátů je u nás používán pouze OMPA a Dimefox v přípravcích Pestox, Terra Sytam a S14 (uvedeno ve směrnících ministerstva zemědělství). Odlišení Dimefoxu od OMPA, které je prakticky nejdůležitější, je možno provést na základě důkazu fluoru obsaženého v molekule Dimefoxu. Při kvantitativním stanovení sekundárního aminu i fosforu může být i poměr mezi oběma složkami určitým vodítkem (ne ovšem k odlišení OMPA od Dimefoxu, v nichž je poměr mezi počtem dimethylaminových skupin a molekul fosforu stejný).

Některé organofosfáty obsahují místo dimethylaminových zbytků v molekule zbytky diethylaminové. V těchto případech se naskytá možnost určit rozdíl ve struktuře po destilaci a izolaci soli příslušného aminu bodem tání vhodného derivátu.

Některé z těchto vyjmenovaných možností ke zvýšení selektivity mají pro praxi malý význam a přicházejí v úvahu jen ve speciálních, důležitých případech, převážně pro důkazy soudní. Obvykle vystačíme se zařazením jedu do skupiny amidofosfátů. Možnost omylu při klasifikaci je zmenšena malým počtem přípravků v praxi u nás používaných.

Literatura

1. Melichar B.: Předneseno na XVII. chem. sjezdu v Olomouci. — 2. Ripper W. E. - Greenslade R. M. - Hartley G. S.: Bull. Entomol. Research. 40, 481, (1950). — 3. Hartley G. S. a spol.: J. Sci. Food. Agric. 2, 303, (1951). — 4. Gardner K. - Owen B. D.: J. Sci. Food. Agric. 7, 470, (1956). — 5. Lacoste R. J., Earing M. H., Wiberley S. E.: Anal. Chem. 23, 871, (1951). — 6. Souček B.: Čas. lék. čas. 86, 947, (1948). — 7. Dowden H. C.: Biochem. J. 32, 455, (1938). — 8. Hall S. A. a spol.: Anal. Chem. 23, 1866, (1951). — 9. Malát M.: Kolorimetrie str. 166, NČSAV Praha 1956. — 10. Stránský Z.: Vet. med. 5, 913, (1960). — 11. Hartley G. S.: Chem. and. Ind. 529, (1954). — 12. Ševčík M.: Praktická toxicologie, Praha SZN 1960.

Аналитика органофосфатов II. Квантитативное определение аминофосфатов

Эта статья является второй частью работы, опубликованной в «Ветеринарии» № 12, 1960 г. стр. 913. Автор описывает свой метод определения аминофосфатов. Преимущество приведенного метода заключается в том, что он прямой и селективный. С его помощью можно установить не только, идет ли речь об отравлении органофосфатом, но и непосредственно классифицировать органофосфат, что может иметь значение при судебном расследовании. Далее этот метод дает возможность достигнуть большей точности — с помощью обычных аналитических способов — чем та, на которую можно рассчитывать при квантитативном определении биохимическим путем. Это особенно резко проявляется у крупного рогатого скота, у которого уровень холинэстеразы в плазме весьма низок (1). Недостаток метода — он требует больше времени по сравнению с биохимическими исследованиями. Весьма удовлетворительна и его чувствительность. Легко можно установить 20—40 мкг ОМРА. При известном приспособлении можно увеличить чувствительность в два раза.

В заключение надо напомнить, что все работы с подозрительным материалом надо проводить осторожно, что необходимо соблюдать все меры безопасности и работать с применением защитных средств.

The Analysis of Organophosphates II. The quantitative Determination of Amidophosphates

This contribution forms the 2nd part of a paper already published in „Veterinární medicína“, 1960, Nr. 12, p. 913. The author gives a description of his own method for the determination of amidophosphates. The advantage of this method is its directness and selectivity. With its aid we can establish not only, that there is an intoxication with organophosphates, but we can also directly classify the organophosphate, which may be of value in cases of forensic investigations. Further, the method enables to gain a greater accuracy in using the common analytic methods, than it is obtainable by means of biochemical quantitative analysis. This is very

significant especially in cattle, among which the cholinesterase levels in the plasma are considerable low. A disadvantage of the mentioned method is a greater demand on time, than it is required by the biochemical examination. Very satisfactory is the sensitiveness. One can without inconvenience determine 20—40 μ g OPMA. After eventual corrections the sensitiveness may be duplicated. Finally, it is necessary to draw the attention to the fact, that all manipulations with suspect matters must be conducted with caution and that it is indispensable to observe the security measures and to work using protective equipment.

Šlesinger L.: Enzymatický rozbor ejakulátů býků s nízkou plodností

Энзиматический анализ эякулятов быков с низкой плодовитостью

Die enzymatische Analyse von Ejakulaten von Bullen mit geringer Fruchtbarkeit

727

Stránský L., Beneš S.: Analytika organofosfátů II.

Аналитика органофосфатов II. Квантитативное определение аминфосфатов

The Analysis of Organophosphates II. The Quantitative Determination of Amidophosphates

733

Sborník ČSAZV - Veterinární medicína vydává Československá akademie zemědělských věd. Uveřejňuje studie, rozborů a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu v oboru veterinární medicíny. — Vychází měsíčně. — Celoroční předplatné 120 Kčs. — Redakce Praha 2, Slezská 7, telefon 577-51, 575-41. — Rozšiřuje Poštovní novinová služba a předplatné přijímá Poštovní novinový úřad a ústřední administrace PNS, třída Obránců míru 2, Brno. Lze také objednat u každého poštovního úřadu nebo doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje Poštovní novinový úřad - vývoz tisku, Štěpánská 27, Praha 1. — Vytiskl Mír, novinářské závody, n. p., závod 2, provozna 22, Legerova 22, Praha 2. A-04*11710



Nezapomeňte si zajistit

SBORNÍKY ČSAZV,

které přináší ve svých tematických číslech významné články o krmivové základně.

Jde o Sborník — Rostlinná výroba č. 9, který kromě jiných prací zdůvodňuje ve svém úvodním článku „Krmivová základna — prvořadý úsek socialistické zemědělské výroby“ význam krmivové základny jako výrobního komplexu, na němž je závislá celá zemědělská výroba.

- Sborník — Rostlinná výroba č. 9 stojí Kčs 18,—.

Sborník — Veterinární medicína věnuje své osmé číslo některým otázkám dietetickým. Můžete jej obdržet za Kčs 10,— v ČSAZV.

Ve Sborníku — Zemědělská ekonomika č. 10 bude kromě příspěvku o nové technologii sklizně obilovin, cukrovky, brambor a kukuřice, zveřejněno několik článků k ekonomice krmiv. Uvedené práce umožní odborníkům v praxi získat co nejvíce poznatků pro řešení problematiky krmivové základny.

- Sborník — Zemědělská ekonomika stojí Kčs 10,—.

Problematické výživy a krmení hospodářských zvířat je věnováno celé deváté číslo Sborníku — Živočišná výroba, v němž kromě úvodního článku dr. Herziga jsou zveřejněny příspěvky k této tematice:

Inž. Lízal: Typové zimní krmné dávky dojníc ve výrobních podtypech bramborářských při tradičním stájovém způsobu krmení.

Dr. Navrátil, inž. Syřínek: Výsledky pokusného ověřování krmných norem pro chovná prasata.

Inž. Šatava: Vliv doplňování vitamínů a antibiotik v dobrých podmínkách výživy na užitkovost slepic a jejich potomstvo.

Dr. Herzig: Přehled koeficientů stravitelnosti krmiv stanovených v ČSSR.

Inž. Kraitr, inž. Aušková, MVDr. Jelínek: Aplikace dietylstilbestrolu při výkrmu kohoutků a estrogenní aktivita tkání a orgánů.

- Sborník — Živočišná výroba si můžete objednat za Kčs 10,— v Československé akademii zemědělských věd, Praha 2, Slezská 7, Poštovním novinovým úřadě, Brno, tř. Obránců míru 2.