

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

4

ROČNÍK 11 (XXXIX)
PRAHA,
DUBEN 1966
CENA 10 Kčs

ÚSTAV
VĚDECKOTECHNICKÝCH
INFORMACÍ MZLH

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král, (předseda), člen korespondent ČSAV akademik Ivan Brauner, doc. MVDr. Jan Čarvaš. CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., prof. MVDr. Tomáš Gdovin, MVDr. Martin Lis, MVDr. Andrej Mačička, MVDr. Ladislav Polák, CSc., doc. MVDr. Oldřich Svoboda, doc. MVDr. inž. Jan Vlček, pplk. MVDr. Miroslav Vojáček, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, CSc., MVDr. Ladislav Zima, MVDr. Alojz Žuffa, CSc.

Vedoucí redaktor František Němec

© Ústav vědeckotechnických informací MZLH, Praha 1965

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací ministerstva zemědělství a lesního hospodářství. Vychází měsíčně. Redakce: Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—

■
Научный журнал VETERINÁRNÍ MEDICÍNA публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных заданиях по научному исследованию в области ветеринарной медицины. Издаёт Институт научно-технической информации Министерства сельского и лесного хозяйства. Выход в свет ежемесячно. Редакция Прага 2, Слезка 7.

■
The scientific journal VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Institute of Scientific and Technical Information of the Ministry of Agriculture and Forestry Management. Issued monthly. Editorial office Prague 2, Slezská 7

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift VETERINÁRNÍ MEDICÍNA veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben vom Institut für wissenschaftlich-technische Informationen des Ministeriums für Land- und Forstwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion Praha 2, Slezská 7

■
Le journal scientifique VETERINÁRNÍ MEDICÍNA publie les études, analyses et traités scientifiques concernant les tâches de recherches résous dans le domaine de médecine vétérinaire. Publié par l'Institut des renseignements scientifiques et techniques du Ministère de l'agriculture et des forêts. Paraît une fois par mois. Rédaction Prague 2, Slezská 7

■ Se zvláštnostmi metabolismu (zejména uhlovodanů) přežvýkavců souvisí hladina ketonových látek a prchavých mastných kyselin v jejich krvi (Kolb 1961).

Názory různých autorů se však rozcházejí v hodnocení fyziologického rozmezí hladiny ketolátek (KL) v krvi (Boďa 1960, Koropov 1956, Páslér 1961) a nejsou rovněž jednotné v hodnocení příčin výkyvů ketonémie, popřípadě vzniku hyperketonémie (Černohous, Lax 1959, Koropov 1956, Reinders 1961, Kolesov, Gorbelyk, Demetev 1959).

Výsledky našeho výzkumu z let 1961–1962 (Spurný, Lebeda 1963) ukázaly, že dynamika hladiny KL v krvi dojníc v průběhu roku významně kolísá a její zvýšení může představovat až 830 % minimálních hodnot, aniž by došlo k příznakům klinického onemocnění.

Kolb (1961) uvádí, že podle dnešních představ je jednou z hlavních příčin „acetonémie“ disproporce mezi potřebou, syntézou a využitím glukózy. Nodostatek glukózy, zejména nedostatečná utilizace glukózy v buňkách, má za následek poruchu koordinace mezi konečným odbouráváním vznikajících uhlikatých sloučenin a odbouráváním mastných kyselin (kdy je omezena oxydace mastných kyselin, která probíhá na normálních podmínkách až na CO_2 a H_2O).

Mastné kyseliny jsou v krvi savců přítomny především v esterifikované formě jako glyceridy, estery sterolu, hlavně estery cholesterolu a fosfolipidy s cerebrosidy (Kóň a 1963). Hladina lipidů v krvi skotu je ovlivňována věkem, graviditou, laktací, výživou a dalšími činiteli. Zatímco věk u krav od první laktace do vyřazení z produkce nemá na hladinu lipidů zřetelný vliv (Kóň a 1963), dochází u laktujících krav k výraznějším změnám (Maynard, Harrison, McCay 1931). U gravidních krav se hladina lipidů těsně před porodem snižuje a po porodu dochází k jejímu zvyšování. Toto zvyšování souvisí pravděpodobně se sekrecí mléka (Kolb 1961). Přívod tuků potravou ovlivňuje hladinu lipidů v krvi. U laktujících krav bylo zjištěno (Williams, Maynard), že při velmi nízkém obsahu tuku v dietě se postupně snižovaly celkové lipidy, fosfolipidy a volný cholesterol; po přidání tuku do krmiva se jejich hladina zvýšila. Kóň a kol. (1962) se zabývali vlivem zkrmování močoviny mladým býčům na hladinu esterifikovaných mastných kyselin (EMK). Během jednoho měsíce zjistili mírné zvýšení hladiny EMK v krvi a výrazné snížení hladiny celkového cholesterolu.

Výsledky našich prací (Lebeda, Surynek, Spurný 1963, Spurný 1963, Spurný, Hrevuš 1962, Spurný, Lebeda 1963) ukázaly, že

obsah KL v krvi dojníc značně kolísá v průběhu roku; max. hladina byla zaznamenána ke konci pastevního období na podzim, kdy byl největší počet zaprahých krav a nejnižší průměrná nádoj. Rovněž byla zjištěna signifikantní rozdílnost v mohutnosti vzestupu KL u dvou stád rozdílně krmených s rozdílnou průměrnou nádojí. Tyto změny však nebyly posuzovány vzhledem k podílu a absolutnímu množství živin v krmné dávce. Na to a na jiné činitele byl brán zřetel v této práci.

Vzhledem k tomu, že KL mají vztah k metabolismu tuků a mastných kyselin, sledovali jsme v tomto pokusu současně hladinu esterifikovaných mastných kyselin.

METODIKA A MATERIÁL

Od 31 dojníc červenostrakatého plemene, klinicky zdravých, rozdělených do dvou skupin (15 a 16 ks) se stejným věkovým rozvrstvením (od 3 do 13 let) byla od února do června ve třítydenních intervalech odebírána krev z *v. jugularis*. Odběry byly prováděny v dopoledních hodinách (mezi 8. a 10. hodinou). Po převezení do laboratoře byla krev uskladněna v chladničce a během několika dní zpracována.

Obě skupiny dojníc měly stejnou krmnou dávku, která obsahovala 5 kg sena a 2 kg slámy; v první fázi pokusu silážované řízky (35 kg na kus a den) a silážovanou smesku (10 kg). Ve druhé fázi pokusu byla přidávána kukuřičná siláž nízké kvality (15 kg) a silážovaná ozimá směska (15 kg), doplněná později ještě sušenými řízky (0,5 kg na kus a den). Kromě této základní krmné dávky dostávaly dojnice individuální přídatky jadrné směsi s komerční minerální přísadou v dávce 0,4 kg na každý litr nádoje nad 8 litrů. Od konce května byly krmeny zelenou vojtěškou (30 kg na kus a den) a současně byla z krmné dávky vyřazena siláž.

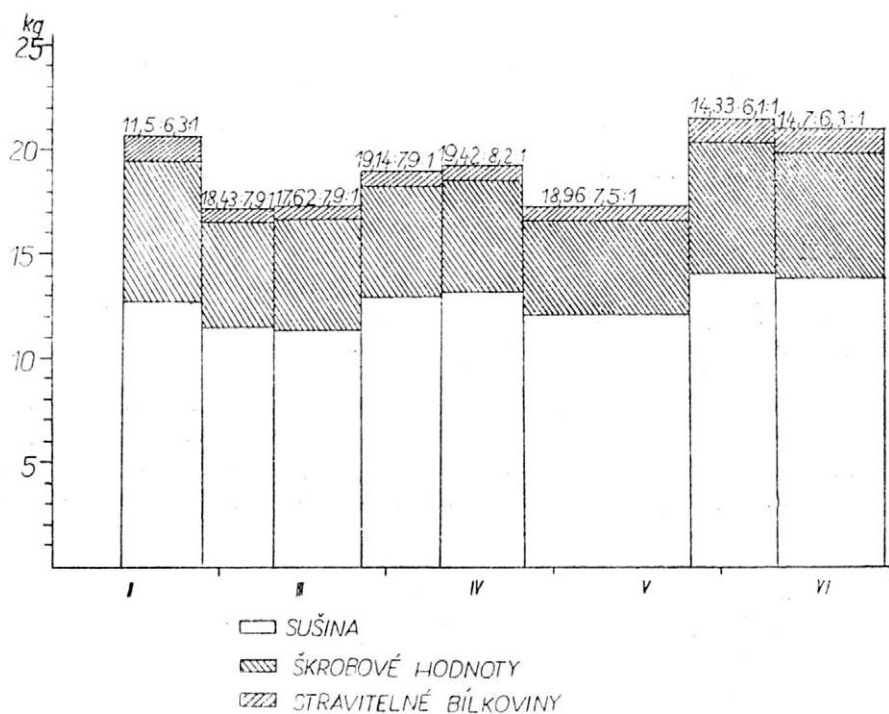
Mimoto skupina krav označená jako B dostávala v nápoji od druhého týdne pokusu po dobu šesti týdnů přídatky minerální směsi obsahující stejný díl NaCl a NaHCO₃, odstupňovaný podle nádoje takto: do 8 l nádoje 100 g směsi, do 15 l 160 g směsi a při nádoji nad 15 l 200 g směsi. Od osmého týdne pokusu do jedenáctého týdne byla tato minerální směs doplněna ještě léčebnou formou Vitázy. Poměr všech tří komponent byl 1 : 1 : 1. Dávky byly opět stupňovány podle nádoje: do 8 l 50 g, do 15 l 100 g a nad 15 l 100 g.

Krmné dávky, sestavené vždy znovu zhruba po 14 dnech, byly zhodnoceny po stránce kvalitativní i do obsahu živin. Obsahy sušiny, stravitelných bílkovin a škrobové hodnoty z krmných dávkách byly vypočítány z tabulek (Kábrt, Lazár 1963) a jsou uvedeny v grafu 1. Z minerálních látek jsme rovněž propočtem z tabulek (Kábrt, Lazár 1963) vyjádřili pouze Ca a P v grafu 2.

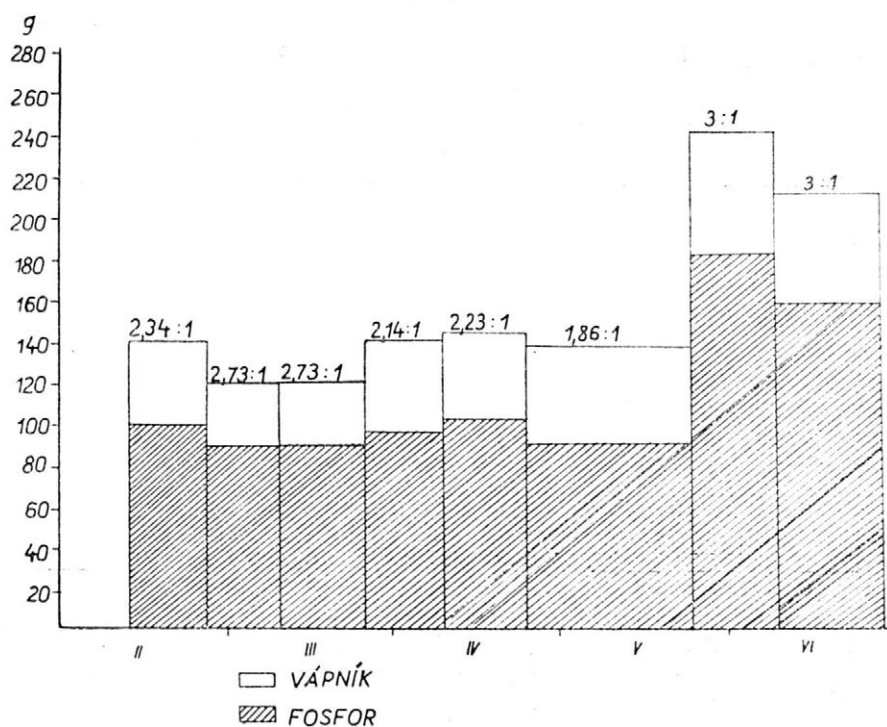
U krav obou skupin byla sledována průměrná denní nádoj v průběhu celého pokusu (průměrná tučnost mléka zjišťována nebyla), ve venózní krvi KL a EMK. Hladina EMK byla však z technických důvodů sledována až od druhé poloviny března.

Ke kvantitativnímu stanovení KL bylo použito kolorimetrické mikrodestilační metody v Conwayových nádobkách. Touto metodou se stanovují odděleně volný aceton, volný aceton a kyselina acetoctová a celkové množství KL. Hodnoty kyseliny acetoctové a beta-oxymáselné se vypočítávají prostým odečítáním (Hořejší, Kandrác, Michalec, Slavík 1957).

Změny hladin KL a EMK v průběhu pokusu (dynamika) byly hodnoceny



1. Poměr sušiny, škrobových hodnot a stravitelných bílkovin v krmné dávce dojnic obou skupin.



2. Poměr vápníku a fosforu v krmné dávce obou skupin (bez přidavku minerální směsi pro skupinu B, tj. NaCl, NaHCO₃ a Vitázy obsahující Ca a P).

t-testem (vždy k výsledkům předešlého odběru krve), rovněž tak byly hodnoceny rozdíly v hladinách těchto látek u obou skupin.

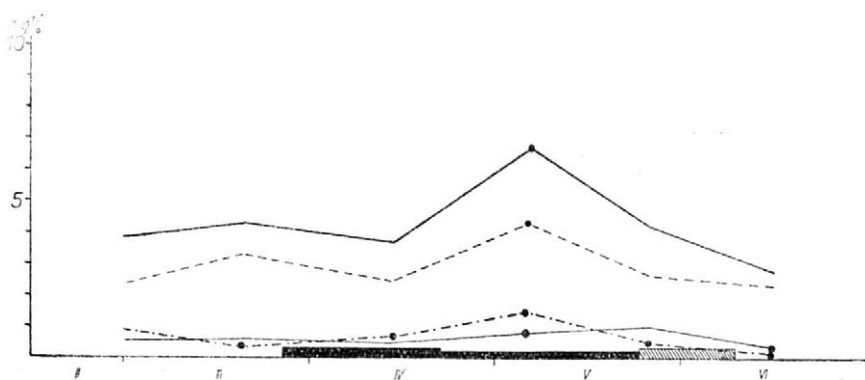
Vztah hladiny KL k hladině EMK byl hodnocen korelačním koeficientem (Picko — Homolka 1956).

VÝSLEDKY

Hladina celkových KL u skupiny dojnic bez minerální přísady nevykazovala v první fázi pokusu signifikantní změny v dynamice. Ve druhé fázi pokusu, kdy byla nasazena nekvalitní kukuřičná siláž, došlo k signifikantnímu vzestupu (téměř o 100 % vzhledem k počátečním hodnotám, tzn. ze 3,75 mg % na 6,71 mg %) a po snížení dávky této siláže opět k význačnému poklesu na hodnoty výchozí. Další pokles, ne však signifikantní, byl zaznamenán po přechodu na zelené krmení. Významnější výkyvy však vykazovala během celého pokusu dynamika hladiny volného acetonu, u něhož došlo k signifikantnímu poklesu ve druhé polovině března (z 0,9 mg % na 0,46 mg % a v době od nasazení kukuřičné siláže naopak k signifikantnímu vzestupu (až na 1,52 mg %). Po omezení dávky kukuřičné siláže a rovněž po přechodu na zelené krmení došlo k jeho signifikantnímu poklesu (z 0,57 mg % na 0,14 mg %). Na celkové množství KL se nejvýznamněji podílela kyselina beta-oxymáselná, nejstabilnější hladinu měly kyselina acetocetová. Hladina obou kyselin však signifikantně vystoupila po nasazení kukuřičné siláže, po omezení její dávky opět signifikantně poklesla (viz graf 3).

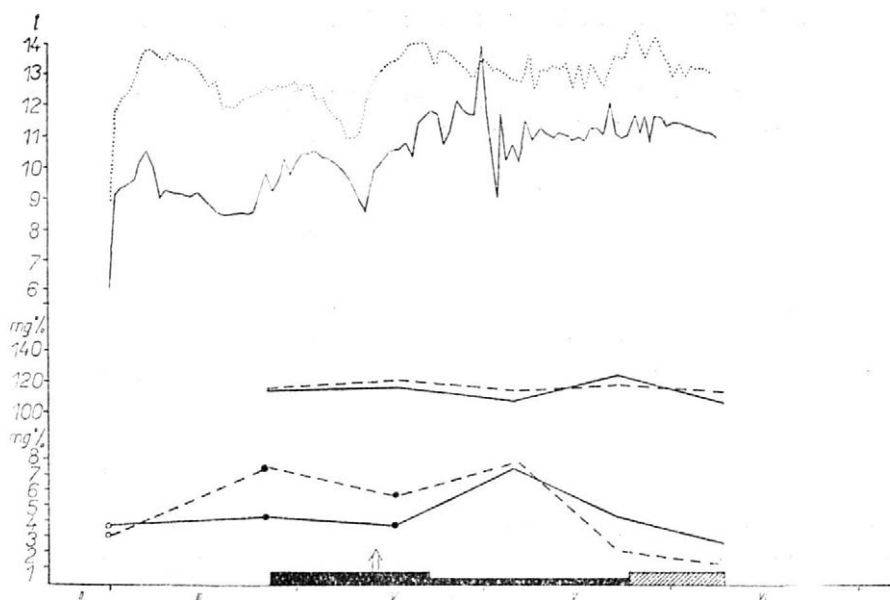
Hladina EMK v krvi jevila opačnou dynamiku (prakticky stejnou u obou skupin) než hladina KL, výkyvy však nebyly signifikantní. Pohybovala se mezi 108 a 124 mg %. (Korelační koeficient mezi EMK a KL je záporný, činí $r_A = -0,525$, $n = \pm 0,2933$; $r_B = -0,0225$, $n = \pm 0,3001$).

U skupiny dojnic označené jako B jsme sledovali, zda lze ovlivnit hladinu KL přidávkou minerálních přísad. Byly zjištěny signifikantní rozdíly v průměrné hladině celkových KL mezi oběma skupinami, avšak jen v první fázi pokusu. V hladině EMK ani v této fázi rozdíly shledány nebyly. Signifikantní roz-



3. Dynamika ketolátů v krvi skupiny dojnic bez minerální přísady (A). Silná čára plná představuje celkovou hladinu ketolátů, křivka přerušovaná hladinu kyseliny beta-oxymáselné, slabá křivka plná hladinu kyseliny acetocetové, čerchaná slabá křivka hladinu volného acetonu. Plné kroužky na křivkách vyznačují statistickou významnost poklesu nebo vzestupu hladiny vzhledem k předchozím hodnotám. Na ose X, která je dělena na měsíce, je vyznačena plným polem velikost dávky kukuřičné siláže, šrafovaným polem přechod na zelené krmení.

díl v celkové hladině KL mezi oběma skupinami (A i B) byl způsoben významným vzestupem hladiny KL v krvi skupiny B hned v první fázi pokusu a v průměru byl u této skupiny vyšší až do doby, kdy byla omezena dávka nekvalitní kukuřičné siláže. Největší rozdíl průměrných hodnot mezi oběma skupinami činil 2,88 mg% (4,28 mg% u skupiny A a 7,16 mg% u skupiny B). Stojí za povšimnutí, že v první fázi pokusu byl rozdíl v průměrné nádoji v průměru vyšší ve prospěch skupiny B, než tomu bylo ve fázi druhé (viz graf 4). Zajímavé je zjištění, že v době, kdy na krátkou dobu poklesla nádoj u obou skupin, tj. na začátku dubna, došlo k poklesu průměrné hladiny KL a k vzestupu hladiny EMK u obou skupin, výkyvy však v žádném případě nebyly statisticky významné (graf 4). Signifikantní byl pouze vzestup průměrné hladiny volného acetonu u obou skupin — A i B (srovnej grafy 3 a 5).



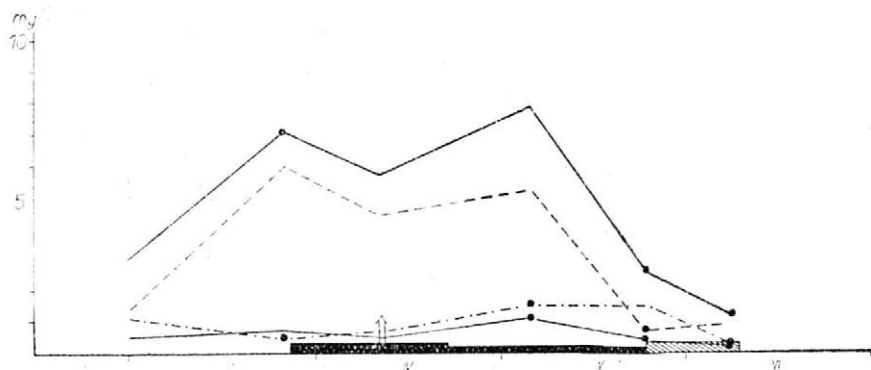
4. V horní části grafu znázorňuje tečkovaná křivka nádoj skupiny B (s minerální přísadou), plná křivka nádoj skupiny A.

Ve střední části grafu hladina EMK — přerušovanou křivkou u skupiny B, plnou křivkou u skupiny A.

V dolní části grafu celkové KL — přerušovanou čarou u skupiny B, plnou čarou u skupiny A. Statisticky významné rozdíly v hladinách obou skupin jsou vyznačeny plným kroužkem, rozdíly blížící se významnosti prázdným kroužkem. Šipka ukazuje, kdy bylo započato s přidáváním minerální směsi.

DISKUSE

Při hodnocení výsledků je nejnápadnější skutečnost, že křivka průměrných hladin všech acetonových látek u skupiny A jeví významnou vzestupnou tendenci po zařazení poměrně velkého množství nekvalitní siláže do krmné dávky. Podle rozboru ÚKZÚZ v Brně šlo o siláž V. a VI. třídy jakosti o značně kyselosti vodního výluhu (1408 a 1071 mg% KOH). Poměr stravitelných bílkovin a škrobové hodnoty v celkové krmné dávce byl v té době podle propočtů z tabulek: 1 : 7,4, tedy dosti vysoký a odpovídající doporučení Reinderse (1961)



5. Dynamika KL u skupiny B. Legenda stejná jako u grafů 3 a 4.

(1:5,6–6), avšak příliš vysoký v neprospěch bílkovin, jejichž nedostatek v krmné dávce je podle Kolesova, Gorbelika a Demeteva (1959) hlavním etiologickým faktorem alimentární ketonémie. Je však otázkou, zda z tabulek propočtený poměr živin odpovídal skutečnosti (chemické rozbory krmiv dělány nebyly) a do jaké míry mohly být živiny využity. Nejpravděpodobnější příčinou vzestupu KL bylo podle našeho názoru ve shodě s některými literárními údaji narušení bachorového trávení a celkového metabolismu vlivem nekvalitní siláže, kdy došlo i k poruše oxydace mastných kyselin. Tomu by nasvědčoval i střední stupeň negativní korelace mezi dynamikou EMK a KL ($r = -0,525 \pm \pm 0,293$). Na příčinách vzestupu KL se pravděpodobně však podílelo i vyšší zatížení organismu zvýšenou průměrnou nádojí a nedostatečné energetické krytí jeho potřeb nekvalitní a i sníženou krmnou dávkou.

Při zdůvodňování rozdílnosti hladin celkových KL mezi oběma skupinami krav je těžko se domnívat, že tato rozdílnost v první fázi pokusu byla ovlivněna speciální minerální směsí v krmné dávce skupiny B. Pravděpodobně se zde uplatňovala jako hlavní příčina rozdílnost v průměrné denní nádoji, a tím i rozdílná zátěž organismu.

Z výsledků této práce je rovněž dost obtížné učinit si konečný názor na příčiny kolísání hladiny fyziologické ketonémie. I když z výsledků naší dřívější práce na tomto úseku (Spurný, Lebed a 1963) vyplynul určitý vztah mezi výškou průměrné nádoje, fází laktace, stupněm gravidity a počtem zaprahých krav, způsobem krmení a krmnou dávkou a z této práce vyplývající pravděpodobnost souvislosti mezi kvalitou krmné dávky (nevvlučujeme přitom ani vlivy minerálních látek v ní zastoupených) a hladinou KL a EMK, jsme si vědomi, že jsme nezávážně komplexně během tohoto poloprovozního pokusu všechny činitele, které podle literárních pramenů hladiny KL a EMK ovlivňují. Významným přínosem pro hodnocení výsledků této práce by byl exaktní chemický rozbor krmných dávek s vyloučením vlivů gravidity a laktace, což bude předmětem dalších pokusů.

SOUHRN

V době od února do června byla sledována v třítydenních intervalech ve venózní krvi hladina ketonových látek (KL) a esterifikovaných mastných kyselin (EMK). Bylo přihlédnuto k nádoji a ke krmné dávce.

Signifikantní vzestup hladiny všech KL byl zaznamenán ve druhé fázi pokusu, kdy byla do krmné dávky zařazena nekvalitní kukuřičná siláž. U EMK byl naopak zaznamenán nevýznamný pokles. Po vyřazení nekvalitní kukuřičné siláže se hladina KL vrátila na výchozí hodnoty, hladina EMK se významně zvýšila a průměrná nádoj byla v této fázi vyšší. Mezi hladinou KL a EMK byla zjištěna negativní stochastická vázanost středního stupně ($r = 0,525 \pm 0,293$).

U skupiny dojnic, kterým byla podávána speciální minerální přísada, obsahující NaCl, NaHCO₃ a Vitázu, byla zjištěna v počáteční fázi pokusu signifikantně vyšší hladina ketoláték. V hladině EMK nebyly zjištěny významné rozdíly. Nádoj u této skupiny byla větší po celé pokusné období, přičemž v první fázi byl tento rozdíl zřetelnější.

I když byly zjištěny ve sledovaných ukazatelích rozdílnosti mezi oběma skupinami dojnic, nepřisuzujeme je vlivu námi použité minerální směsi, nýbrž uplatňují se zde zřejmě více vlivy krmení a laktace, popřípadě i gravidity.

Došlo dne 18. 10. 1963

Literatura

1. BOĎA, K.: Patologická fyziologie výměny látek; Poruchy tukového metabolismu; = Bođa-Lebeda-Mach, Speciální patologická fyziologie zvířat. Praha, SPN 1960, s. 105-110. — 2. ČERNOHOUS, J. - LAX, T.: O acetonémii skotu. = „Veterinářství“, 9, 1959, č. 6, s. 207-211 (cit. ROBERTSON, THIN). — 3. HOŘEJŠÍ, J. - KANDRÁČ, M. - MICHALEC, Č. - SLAVÍK, K.: Základy chemického vyšetřování v lékařství, SZN Praha 1957, s. 134. — 4. KÁBRT, J. - LAZAR, J.: Výživa a dietetika hospodářských zvířat. Praha, SZN 1963, s. 436. — 5. KAPLAN, V. A. - SVIRIDENKO, V. A.: Rezervnaja ščeločnosť i soderžanie v krovi letučich žirnych kislot i acetonovyh tel u krupnogo rogatogo skota. = In: „Veterinarija“ 34, 1962, č. 2, s. 51-52. — 6. KOLB, E.: Kohlenhydratstoffwechsel und Propionattherapie bei Wiederkäuern. = „Der praktische Tierarzt (Sonderdruck)“, 1961, č. 10, s. 373-377. — 7. KOLESOV, A. M. - GORBELIK, P. V. - DEMETEV, I. L.: Alimentarnaja ketonuriya sujagnyh ovec. = Trudy saratovskogo zooveterinarnogo instituta, 9, Saratov 1959, s. 205-211. — 8. KŮŇA, E.: Kandidátská disertační práce. Veterinární fakulta Košice, 1963, s. 161, 13 příl. — 9. KŮŇA, E. - BOĎA, K. - TOMÁŠ, J.: Změny hladiny esterifikovaných mastných kyselin, fosfolipidů a chlesterolu v krvi býčků po krmení močovinou. = „Veterinárský časopis“, 5, 1962, s. 449-453. — 10. KOROPOV, V. M.: Patologičeskaja fiziologija. = Trudy MVA, tom 15, Moskva 1956, s. 3-5 (cit. WEIS a CLARK). — 11. LEBEDA, M. - SURYNEK, J. - SPURNÝ, O.: Pokus o ovlivnění alkalické rezervy krve a plazmy dojnic minerální přísadou ke krmivu. Referát na Druhých dnech fyziologie hospodářských zvířat v Liblicích 1963. — 12. MAYNARD, L. A. - HARRISON, E. S. - Mc CAY, C. M.: = „J. Biol. Chem.“ 92, 1931, s. 263. — 13. PÁSLER, M.: Hladina ketonových látek v krevním séru skotu. Diplomová práce, Brno 1961. — 14. PICKO, V.: Statistické hodnocení výsledků. = „Chemická diagnostika v dětském věku“ J. HOMOLKY, SZN Praha, 1956, s. 449. — 15. POLUCHIN, F. S.: Dinamika ketonových tel i drugih pokazatelej krovi produktivnyh korov pri narušení obmena veščestv s javlenijami patologičeskich izmenenij v pečeni. = Trudy MVA, tom 36, Moskva 1961, s. 31-40. — 16. REINDERS, J. S.: Acetonämie und Fütterung. = „Tijdschrift voor Diergeneeskunde“, 86, 1961, č. 7, s. 462-474. — 17. SPURNÝ, O.: Pohyb hladiny ketonových látek v krvi dojnic v průběhu roku. Diplomová práce. Veterinární fakulta Brno 1963. — 18. SPURNÝ, O. - HREVUŠ, R.: Alkalická rezerva a ketonové látky v krvi dojnic rozdílně krmených v průběhu roku. Referát na studentské vědecké konferenci. Veterinární fakulta Košice 1962. — 19. SPURNÝ, O. - LEBEDA, M.: Změny hladiny ketonových látek v krvi krav v průběhu roku. = „Sborník VŠZ, řada B, XI, 1963, č. 2. — 20. WILLIAMS, H. H. - MAYNARD, L. A.: = „J. Dairy Sci.“, 17.

Уровень кетонových веществ и жирных кислот в крови дойных коров в предвесенний и весенний периоды

C февраля по июнь месяц в трехнедельных интервалах в венозной крови изучался уровень кетонových веществ (KB) и эстерифицированных жирных кислот (ЭЖК). При этом учитывались надой и кормовая рация. Заметное повышение уровня всех KB было отмечено во второй фазе

опыта, когда в кормовой рацион был включен некачественный кукурузный силос. ЭЖК, наоборот, было отмечено незначимое понижение. После исключения некачественного кукурузного силоса уровень КВ опустился на первоначальное значение, уровень ЭЖК значительно повысился и среднесуточный надой в этой фазе был самым высоким. Между уровнем КВ и ЭЖК была установлена отрицательная стохастическая зависимость средней степени ($r = -0,525 \pm 0,293$). У группы дойных коров, в корм которых добавляли специальную минеральную смесь, содержащую NaCl, NaHCO₃ и Витапу, в начальной фазе опыта был установлен заметно более высокий уровень кетовеществ. В уровне ЭЖК не было установлено значительных различий. Надой у этой группы был более высоким в течение всего опытного периода, причем в первой фазе это различие было отчетливее. Хотя в изучаемых показателях были установлены различия между обеими группами дойных коров, мы не относим это за счет влияния примененной минеральной смеси, а здесь, вероятно, больше проявляется влияние кормления и лактации, а при случае и беременности.

The Level of Ketone Substances and Fatty Acids in Blood of Milch-Cows in the Early Spring and Spring

The levels of ketone-substances (KS) and esterified fatty acids (EFA) in venous blood were followed from February to June in three-weeks' intervals. The authors allowed for the quantity of milk gained, and for the ration. A significant increase of the level of all KS was being observed in the second period of the experiment, when maize-silage of low quality was used as part of the ration. On the contrary, only a slight decrease was observed in EFA. The level of KS came to the initial value after the scrapping of the maize-silage of bad quality with the EFA-level increasing significantly, and the average milk-yield being higher at this stage. Negative stochastic middle-degree dependence ($r = -0,525 \pm 0,293$) was ascertained between the levels of KS and EFA. In a group of milch-cows having been given a special mineral additive containing NaCl, NaHCO₃, and Vitase, a significantly higher level of ketone substances was ascertained in the initial stage of the experiment. No significant differences were found concerning the EFA-level. The milk-yield in this group was higher for the whole period of the experiment, the difference being most outstanding in the first phase. Although certain differences between both groups of milch-cows have been ascertained concerning the followed indices, we do not think them to be caused by the mineral mixture used, but apparently the effects of feeding and lactation, or of pregnancy make themselves more felt.

Ketonstoffs- und Fettsäurenspiegel im Blut der Milchkühe in der Vorfrühlings- und Frühlingsperiode

Von Feber bis Juni wurde in dreiwöchigen Intervallen im venösen Blut der Spiegel der Ketonstoffe (KSt.) und esterifizierten Fettsäuren (EFS) verfolgt. Dabei wurde auch die Milchleistung sowie die Futterration berücksichtigt. Eine signifikante Steigerung des Spiegels aller KSt. wurde in der zweiten Phase des Versuchs festgestellt, wo in die Futterration Maissilage schlechter Qualität eingereicht wurde. Bei den EFS, dagegen wurde ein nicht signifikanter Abfall des Spiegels vermerkt. Nach Ausschaltung der Maissilage fiel der KSt.-Spiegel auf das Ausgangsniveau herab, der EFS-Spiegel erhöhte sich signifikant und die durchschnittliche Milchleistung der Kühe war in dieser Phase des Versuchs höher. Zwischen dem KSt.- und EFS-Spiegel wurde eine negative stochastische Abhängigkeit mittleren Grads ($r = -0,525 \pm 0,293$) festgestellt.

Bei der Gruppe von Milchkühen, welchen ein spezielles Mineralgemisch mit NaCl- und NaHCO₃-Gehalt und das Präparat Vitaza verabreicht wurden, wurde in der Anfangsphase des Versuchs ein signifikant höherer Ketonstoffs-Spiegel vorgefunden, während im EFS-Spiegel keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Die Milchleistung dieser Gruppe von Kühen war in der gesamten Versuchsperiode höher, wobei dieser Unterschied in der ersten Versuchsphase ausgeprägter war. Obwohl zwischen beiden Milchkühegruppen Unterschiede in den untersuchten Kennziffern festgestellt wurden, erklären wir sie nicht durch einen Einfluss des benutzten Mineralgemisches, sondern unserer Ansicht nach kommen hier augenscheinlich mehr der Einfluss der Fütterung und Laktation, beziehungsweise der Einfluss der Gravidität zur Geltung.

Adresy autorů:

MVDr. Oldřich Spurný, MVDr. Jaroslav Surynek, CSc., VŠZ, veterinární fakulta, katedra patologické fyziologie, Brno, Palackého 1-3

■ Nedostatek bílkovin živočišného původu v krmných dávkách hospodářských zvířat nás nutí hledat nové zdroje těchto životně důležitých látek a především dokonale využívat všech odpadů živočišného původu na jatkách, v rybích výrobnách a v dalších závodech zpracovávajících živočišné produkty. Na plnění těchto úkolů se podílí značnou měrou i veterinární zařízení prostřednictvím veterinárně asanačních ústavů, kafilérií, kde jsou při likvidaci odpadů živočišného původu užívány známé a ověřené technologické postupy, které zaručují zdravotní nezávadnost a dobrou biologickou hodnotu vyráběných živočišných mouček.

V současné době je v provozu nové technologické zařízení na výrobu živočišných mouček z odpadních surovin, které ve výrobním procesu užívá jako extrakční činidlo xylen, což je pro tuto technologii neobvyklé. Jelikož ve finálním výrobku zůstává určité množství xylenů, o jehož působení *per os* na zdravotní stav zvířat není dostupných literárních údajů, byl proveden orientační biologický pokus se zkrmováním této moučky prasatům.

PŘEHLED LITERATURY

Poznatky získané studiem literatury se týkají především vlivu xylenů na organismus ve stavu plynném, tedy účinku xylenových par. Podle Marholda (1964) působí xylen narkoticky a dráždivě. Batchelor, cit. podle Lazareva (1959), uvádí, že při chronické otravě bílých krys xylenovými parami (koncentrace 4,3 mg/l) nedošlo k žádným zvlášť výrazným změnám v krvi. Při pitvě však byly zjištěny hyperplastické změny v kostní dřeni a ve slezině, kalné zduření a hyperemie ledvin. Dále uvádí Lazarev (1959), že u králíků a koček vyvolaly koncentrace 5 nebo 10 mg/l (4 hodiny denně po dobu 55 dní) pokles počtu červených krvinek a obsahu hemoglobinu, leukocytózu a v začátečních stadiích lymfopenii. Brenda u, citováno podle Lazareva (1959), uvádí dva případy těžké anémie těhotných žen, které pracovaly s xylenem. Naproti tomu Marhold (1964), říká, že xylen tvorbu krve asi neovlivňuje, a také Homolář (1958) považuje poškození krvetvorby u člověka za méně časté. Browning (1953) uvádí letální dávky na 1 kg živé váhy u jednotlivých izomerů xylenů takto: pro o-xylen 2,22, m-xylen 1,65 a p-xylen 1,36 ml na 1 kg. Lze uvést, že xylen (směs izomerů) je při použití u zvířat 1,3krát jedo-

*) Biochemická sledování konali Dobroslav Žerníček a B. Lojkásková.

vatější než benzen (Gerande, cit. podle Marholda 1964) a narkotičtější než toluen. Údaje o toxicitě xylenu při použití *per os* nejsou v literatuře uvedeny. Jsou k dispozici jen údaje z norem SSSR, kde je dovolena nejvyšší koncentrace xylenu na 100 kg živé váhy 0,1 mg (podle sdělení SLD Brno).

METODIKA A MATERIÁL

Do pokusu, ve kterém jsme sledovali účinek xylenu podávaného *per os* na zdravotní stav, bylo zařazeno 12 prasat (kříženců Cornwall X Bílé ušlechtilé prase) o průměrné váze asi 60 kg. Prasata byla rozdělena do tří skupin o vyrovnané váze i pohlaví. Kontrolní skupina vážila 242 kg, 1. pokusná skupina rovněž 242 kg a 2. pokusná skupina 239 kg. V každé skupině byly dvě prasničky a dva vepři.

Základní krmná dávka byla u všech tří skupin stejná a skládala se z bramborových vloček, ječného šrotu, kukuřičného šrotu a minerální krmné přísady. Množství podávaného krmiva jsme postupně upravovali tak, aby celková dávka odpovídala krmným normám příslušné váhové kategorie prasat. Všem skupinám byla přidávána rybí moučka v množství 11 dkg na kus a den, ale s rozdílným obsahem xylenu. Kontrolní skupina dostávala rybí moučky bez obsahu xylenu, 1. pokusná skupina s obsahem xylenu 0,17 % a 2. pokusná skupina s obsahem xylenu 1,17 %.

Pokus probíhal 65 dní, z toho 10 dní trvalo přípravné období, ve kterém si zvířata zvykala na nové prostředí a ošetřování. Během pokusného období bylo denně sledováno přijímání krmiva a celkový zdravotní stav zvířat. Před zahájením pokusného období, uprostřed pokusného období a při odporažení prasat jsme odebrali krev pro stanovení některých biochemických ukazatelů [spektrum sérových bílkovin metodou podle Homolky (1960) a aktivitu sérového albuminu podle Vlčka a kol. (1963)]. Při závěrečném odběru bylo provedeno stanovení počtu červených krvinek metodou Bürkerovou. Vážení zvířat bylo uskutečněno při zahájení a při ukončení pokusu, dále jsme provedli zvážení prasat po porážce ke stanovení výtěžnosti.

Porážka prasat proběhla ve dvou etapách. Polovina zvířat z každé skupiny byla odporážena ihned po ukončení pokusného období, tedy bez vypuštění xylenu z krmné dávky, zbývající část zvířat po dvoudenním vyřazení rybí moučky s obsahem xylenu z krmné dávky.

Po porážce byl z každého prasete odebrán vzorek masa, tuku a jater a po příslušné úpravě bylo provedeno degustační zhodnocení předložených vzorků podle Groha (Herziga kol. 1961). Vzorky jater byly vyšetřeny histologicky.

VÝSLEDKY

Jak již bylo uvedeno, byla krmná dávka u všech skupin stejná a prakticky se lišila jen rozdílným obsahem xylenu v rybí moučce. Pro přehlednost uvádíme spotřebu rybí moučky a xylenu na jeden kus za celé pokusné období podle skupin:

	rybí moučky	xylenu
kontrolní skupina	6,05 kg	bez obsahu xylenu
1. pokusná skupina	6,05 kg	10,285 g
2. pokusná skupina	6,05 kg	70,785 g

Průměrné množství spotřebovaného krmiva činilo za období 65 dnů na kus a den 2,66 kg. Rozdíly ve spotřebě krmiva na 1 kg přírůstku v jednotlivých skupinách byly velmi malé a nelze je považovat za průkazné, jak je patrné z tabulky I.

I. Spotřeba krmiva na 1 kg přírůstku ž. v.

Skupina	Celkem	Bramborové vločky	Ječný šrot	Kukuřičný šrot	Rybí moučka
Kontrolní	4,648	1,65	1,47	1,37	0,158
1. pokusná	4,844	1,70	1,53	1,42	0,164
2. pokusná	4,669	1,65	1,48	1,38	0,159

V tabulce II uvádíme průměrné hodnoty dosažené u jednotlivých skupin, a to pokud jde o váhu zvířat, přírůstek živé váhy, váhu půlek po poražení zvířat a výtěžnost.

Z tabulky II je vidět, že podávání rybí moučky extrahované xylenem nemělo ani při zvýšeném obsahu xyleny v rybí moučce (2. pokusná skupina) nepříznivý účinek na přírůstky živé váhy prasat a nebyla ovlivněna výtěžnost. Je si však třeba uvědomit skutečnost, že podávání rybích mouček s obsahem xyleny bylo prováděno poměrně krátkou dobu 55 dní a u prasat v období dobré růstové schopnosti (60–100 kg ž. v.).

II. Průměrné hodnoty dosažené u jednotlivých skupin prasat

Skupina	Prům. váha zv. na zač. pokusu kg	Prům. váha na konci pokusu kg	Průměrný denní přír. kg	Průměrná váha masa po porážce kg	Výtěžnost %
Kontrolní	60,5	98,62	0,586	79,25	80,35
1. pokusná	60,5	97,25	0,566	78,25	80,46
2. pokusná	59,75	97,50	0,583	79,125	81,04

Sledování celkového zdravotního stavu a příjmu krmiva jsme prováděli denně při ranním krmení, kdy byla do krmiva zamíchávána rybí moučka. Při zahájení zkrmování rybí moučky s obsahem xyleny bylo u 2. pokusné skupiny, kde činil obsah xyleny v moučce 1,17 %, zjištěno mírné nechutenství projevující se sníženou žravostí a nevyžráním krmné dávky. Tyto příznaky nechutenství za 2–3 dny vymizely a v celém dalším období nebyly již upozorovány. Zjištěné nechutenství u prasat 2. pokusné skupiny si vysvětlujeme tím, že předkládané krmivo velmi intenzívně páchlo po xyleny a tím zřejmě vyvolalo u zvířat odpor.

Jak uvádí Marhold (1964), dochází u xyleny velmi snadno k návyku a po krátké době dojde k otupení čichu. Tím si lze vysvětlit, že v dalším období jsme příznaky nechutenství u pokusných zvířat již neupozorovali.

V průběhu pokusu jsme provedli třikrát odběr krve pro analýzu krevního séra elektroforeticky (Homolka 1960) a stanovení aktivity sérového albuminu (Vlček a kol. 1963). Získané výsledky jsou obsaženy v tabulce III.

III. Výsledky biochemických sledování

Datum	Celk. bílk.	Relativní %			g%			%ASA	g% ASA
		SA	alfa	beta + gama	SA	alfa	beta + gama		
Skupina kontrolní									
15. 8. 64	6,72	37,3	33,4	29,3	2,51	2,24	1,97	20,7	0,561
16. 9. 64	6,03	42,1	24,1	33,8	2,54	1,45	2,04	21,3	0,542
15. — 17. 10.	6,13	46,9	22,0	31,1	2,88	1,35	1,90	32,9	0,843
Skupina 1. pokusná									
15. 8. 64	6,19	41,7	25,2	33,1	2,58	1,57	2,04	21,9	0,579
16. 9. 64	6,21	42,6	24,2	33,2	2,64	1,50	2,07	20,6	0,546
15. — 17. 10.	6,38	47,1	23,5	29,4	3,01	1,50	1,87	20,1	0,600
Skupina 2. pokusná									
15. 8. 64	6,62	39,6	28,6	31,8	2,63	1,88	2,11	24,2	0,631
16. 9. 64	6,48	40,9	27,9	31,2	2,65	1,81	2,02	14,9	0,415
15. — 17. 10.	6,41	48,8	22,7	28,5	3,13	1,46	1,82	12,4	0,324

Vysvětlení: SA sérový albumin, ASA aktivita sérového albuminu.

Při srovnání výsledků získaných analýzou krevního séra jednotlivých skupin lze říci, že celková bílkovina nejvíce v žádné skupině podstatné rozdíly. Sérový albumin u všech skupin má stoupající tendenci v relativních procentech i gramprocentech. Alfa globulin má tendenci klesající u všech skupin. Globulin beta i gama nemá u žádné skupiny podstatné změny v relativních procentech, ale v gramprocentech se mírně snižuje. Aktivita sérového albuminu se u kontrolní skupiny zvyšuje, u 1. skupiny pokusné je prakticky beze změny, ale u 2. pokusné skupiny silně klesá. Rozdíl je nejpatrnější při skončení pokusu, kdy dosahuje aktivita sérového albuminu u 2. pokusné skupiny asi jedné třetiny hodnot skupiny kontrolní a asi polovičních hodnot 1. pokusné skupiny.

Změny ve spektru sérových bílkovin jsou u všech skupin podobné, a je nutné je hodnotit jako projev vývojové fáze organismu, ovšem závisle na jeho stavu a vlivu vnějších faktorů, např. krmiva.

Námi zjištěné biochemické hodnoty u kontrolní skupiny jeví změny působené vývojovou fází organismu. U 1. pokusné skupiny došlo ke snížení aktivity sérového albuminu proti kontrolní skupině. U 2. pokusné skupiny lze silně sníženou aktivitu sérového albuminu pokládat za výraz toxicity xylenu, která se projevila snížením syntézy bílkovin v jaterních buňkách, bez trvalých klinických příznaků.

Jak uvádí L a z a r e v (1959), působí xylencové páry na pokles počtu červených krvinek, popřípadě hemoglobinu. V našem případě jsme odebrali krev k hematologickému vyšetření při ukončení pokusu a stanovili počet červených krvinek. Zjištěné hodnoty byly u kontrolní skupiny 7,7 miliónu, u 1. pokusné skupiny 6,8 miliónu a u 2. pokusné skupiny 6,8 miliónu; pohybují se tudíž ve fyziologických mezích, i když hodnoty zjištěné u skupin pokusných jsou při dolní hranici normálu.

Při porážce zvířat byl zjišťován patologicko-anatomický nález a vzaty vzorky jater na histologické vyšetření. Mimo chronické bronchopneumonické změny na plicích v různém rozsahu nebyly zjištěny žádné další patologicko-anatomické změny a také histologické vyšetření vzorků jater bylo negativní.

Degustační zkouškou, která byla provedena za přítomnosti skupiny odborníků, bylo ohodnoceno maso, tuk, játra a vývar masa. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IV.

IV. Výsledky degustační zkoušky

Skupina	Maso		Tuk	Játra	Vývar
	vařené	pečené			
Kontrolní	74,53 b.	82,63 b.	bez smysl. změn	bez smysl. změn	slabě nažloutlý, vůně čistá, méně výrazná chuť, bez pachutí
1. pokusná	73,65 b.	73,38 b.	bez smysl. změn	bez smysl. změn	slabě nažloutlý, vůně méně výrazná, chuť výrazná, čistá
2. pokusná	67,26 b.	68,42 b.	odchylný pach	2 × označena jako nahořklá	slabě nažloutlý, vůně a chuť bez znatelného pachu

Při degustačním hodnocení masa, tuku a jater ze zvířat poražených ihned po skončení zkrmování rybí moučky byly výsledky jednoznačně nepříznivé pro maso a tuk u 2. pokusné skupiny, jak ukazuje tabulka IV. U vzorků masa 2. pokusné skupiny bylo nejnižší bodové ohodnocení ovlivněno především malým počtem bodů při hodnocení chuti a vůně. U vzorku tuku 2. pokusné skupiny byl osmi členy z devítičlenné komise shledán mírně odchylný pach a chuť a také játra vykazovala určité chuťové změny (hořkost). Vývar masa neprokázal žádné rozdíly mezi skupinami, což lze částečně vysvětlit nevhodností vepřového masa pro vaření.

Druhá degustační zkouška, provedená z masa prasat poražených po dvou dnech vypuštění moučky s obsahem xyleny z krmné dávky, a po uchování vzorků několik dnů v lednici neprokázala žádné rozdíly v chuti a vůni mezi skupinami.

DISKUSE

Uvedené výsledky jsou prvním příspěvkem k řešení problematiky týkající se vlivu živočišných mouček s obsahem xyleny na zdravotní stav a jakost produktů u prasat. Přes malý počet jedinců ve skupinách, což bylo zaviněno nedo-

statečnou kapacitou pokusných stájí, jsme došli v některých případech k jednoznačným závěrům.

Nepříznivé působení xylenů se nám projevilo u 2. pokusné skupiny, kde byl obsah xylenů v moučce 1,17 %. Zde došlo k projevu mírného nechutenství v prvních dnech pokusného období, ke změně v biochemických ukazatelích, které svědčí o narušení některých funkcí jaterních, a konečně bylo prokázáno nepříznivé působení xylenů na jakost masa a tuku této skupiny. Lze usuzovat, že daleko výrazněji by se nepříznivé působení této dávky xylenů projevilo u zvířat mladších, při chronickém podávání, a mohlo by dojít k vážnějším ekonomickým ztrátám u takto krmených prasat, zejména k znehodnocení masa a tuku.

Při hodnocení ukazatelů, zjištěných u 1. pokusné skupiny s obsahem 0,17 % xylenů v rybí moučce, lze uvést, že xylen se v této dávce nebude klinicky nepříznivě projevovat. I zde je však třeba značné opatrnosti, neboť biochemické analýzy nám signalizují určité nebezpečí poškození činnosti jater, která sice nevedou ke změnám prokazatelným histologicky, popřípadě patologicko-anatomicky, ale mohou u některých zvířat, např. březích nebo latentně nemocných, zhoršit celkový zdravotní stav.

Získané výsledky nás opravňují k tomu, požadovat přípustnou hranici obsahu xylenů v rybí moučce 0,1 ml na 1 kg, jak stanovila komise pro hodnocení extrakčního systému za použití xylenů (MZLVH, čj. 68 240/64-43, 1964).

Výsledky, kterých jsme dosáhli u 1. pokusné skupiny, lze srovnávat s výsledky, které byly získány na ÚKZÚZ Brno, ÚKZÚZ Praha, OVZ Hodonín, a s našimi nálezy se shodují (MZLVH, čj. 68 240/64-43, 1964).

ZÁVĚR

Při zkrmování živočišných mouček vyrobených ze surovin pomocí xylenů je třeba požadovat, aby přípustné množství xylenů činilo nejvýše 0,1 ml na 1 kg moučky. Zkrmování mouček s vyšším obsahem (1,17 %) nedoporučujeme, neboť v našem pokusu došlo k přechodnému narušení zdravotního stavu, prokázanému klinicky i biochemicky, a ke změně v jakosti masa a tuku takto krmených zvířat. Proto při vyšším obsahu xylenů doporučujeme včasné vyřazení moučky z krmné dávky před porážkou. Také u zvířat nutně odporažených, kterým byla zkrmována rybí moučka s obsahem xylenů, je nebezpečí smyslových změn v produktech z těchto zvířat získaných.

S ohledem na skutečnost, že krmiva živočišného původu jsou zařazována do krmných směsí pro prasata do 50 kg, selata a prasnice, týkají se výše uvedené poznatky především těchto kategorií prasat.

Došlo dne 16. 12. 1963

Literatura

1. BROWNING, E.: Toxicity of industrial organic solvents. Her Majesty's stationery office, London, 1953. — 2. HERZIG, J. a kol.: Výkrm hospodářských zvířat. ČSAZV + SZN, 1961. — 3. HOLOMÁŇ, K. - NOSÁL, M. - VÁMOŠI, M.: Toxiko-

logia. Osveta, Martin, 1958. — 4. HOMOLKA, J. a kol.: Elektroforesa bílkovin na papíře. = „Časopis lékařů českých“, 1960, č. 3-4, s. 78-83. — 5. LAZAREV, N. V.: Chemické jedy v průmyslu. Stát. zdrav. nakl., Praha, 1959. — 6. MARHOLD, J.: Přehled průmyslové toxikologie. Stát. zdrav. naklad., Praha, 1964. — 7. VLČEK, J. - MELICHAAR, B. - ŽERNÍČEK, D.: Závěrečná zpráva úkolu R 4-2-5, VÚVL Brno, 1963. — 8. Zápis komise MZLVH pro hodnocení technologie a výrobků Výrobní bílkovinných krmiv v Hodoníně, MZLVH, Praha, č. j. 68 240/64-43, 30. IX. 1964.

Действие экстрагированной ксиленом рыбной муки на состояние здоровья и органолептические свойства мяса и сала свиней

При скармливании муки животного происхождения, изготовляемой из сырья при помощи ксилена, следует соблюдать, чтобы допустимое количество ксилена составляло не более 0,1 мл на 1 кг муки. Скармливание муки с более высоким содержанием (1,17 %) мы не рекомендуем, так как в нашем опыте произошло временное нарушение состояния здоровья, доказанное клинически и биохимически, а также изменение качества мяса и сала таким образом кормленых животных. Поэтому, при более высоком содержании ксилена мы рекомендуем своевременное исключение муки из кормового рациона перед убоем. Также у животных с вынужденным забоем, которым скармливалась рыбная мука с содержанием ксилена, не исключается опасность органолептических изменений в полученных из этих животных продуктах. Учитывая факт, что корма животного происхождения включены в кормосмеси для свиней весом до 50 кг, порсят и свиноматок, вышеприведенные данные касаются прежде всего этих категорий свиней.

Effect of Fish-Meal Extracted by Xylene on the Health Condition and Organoleptical Properties of Meat and Fat of Pigs

When feeding animal meals produced from raw material by xylene it must be demanded, that the admissible quantity of xylene should not exceed 0.1 ml per 1 kg of the meal. We cannot recommend the feeding of meal with a higher content of xylene (1.17 %), as animals fed in this way showed a transient health disorder clinically and biochemically proved in our experiment, and also a change of the meat- and fat-quality. That is why we recommend a timely elimination of meat with eventual higher xylene content out of the ration before slaughtering. There exists a danger also in emergency-slaughtered animals which were being fed fish-meal containing xylene, that products from such animals will have devious organoleptical properties. With regard to feedstuffs of animal origin being given into the feed mixtures for pigs up to 50 kg of weight, piglets and sows, the above-mentioned experience concerns above all these categories of pigs.

Wirkung des mit Xylen extrahierten Fischmehls auf den Gesundheitszustand und die organoleptischen Eigenschaften des Fleisches und Fettes der Schweine

Bei der Verfütterung von aus Rohstoffen mit Hilfe von Xylen gewonnenen tierischen Futtermehlen soll der zulässige Höchstgehalt des Xylens 0,1 ml je 1 kg Mehl betragen. Die Verfütterung von Fischmehlen mit einem höheren Xylengehalt (1,17 %) wird nicht empfohlen, da sich in unserem Versuch vorübergehende, klinisch und biochemisch nachweisbare Störungen des Gesundheitszustandes und Veränderungen der Fleisch- und Fettqualität der derart gefütterten Tiere einstellten. Deshalb empfehlen wir bei eventuellem höherem Xylengehalt eine rechtzeitige Ausschaltung des Mehles aus der Fütteration vor dem Schlachten der Schweine. Auch bei den notgeschlachteten Schweinen, welchen Fischmehl mit einem höheren Gehalt von Xylen verabreicht wurde, muß man mit dem Risiko organoleptischer Veränderungen in den von diesen Tieren gewonnenen Produkten rechnen. Mit Hinsicht darauf, daß

die Futtermittel tierischer Herkunft in die Futterrationen für Schweine bis 50 kg Lebendgewicht, als auch für Sauen und Ferkel eingereicht werden, betreffen die angeführten Erkenntnisse vor allem diese Kategorien von Schweinen.

Adresa autorů:

Doc. MVDr. inž. Jan Vlček, CSc., Ivan Herzig, prom. vet. lékař, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky

■ Pri dlhodobom komplexnom štúdiu hladín gonadotropných hormónov na rôznych objektoch hospodárskych zvierat za odlišných fyziologických okolností Arendarčík a kol. (1964), žiada sa z hľadiska správneho metodického prístupu v tejto náročnej experimentálnej problematike preveriť resp. modifikovať aj tie spôsoby testov a vyšetrení, ktoré v humánnej endokrinológii zaznamenali skromné pozitívne výsledky.

LITERÁRNY PREHĽAD

Z dosiaľ používaných metód pri izolovaní gonadotropínov sme použili pri ich titrovaní mnohých biologických testov a biochemických vyšetrení Itze a kol. (1965). Z imunobiologických metód sme potom použili precipitačnej prstencovej interfacialnej reakcie v tekutom prostredí, dvojitej agarovej precipitácie Ouchterlonyho, ako aj hemaglutinačného inhibičného testu Itze a kol. (v tlači).

Hemaglutinačnej techniky použitej mnohými výskumníkmi v serologickom určovaní gonadotropných hormónov Schwierczyńska a kol. (1961), Wide a kol. (1960) sú reakcie vysoko citlivé, ale s mnohými nedostatkami, ktoré pri reprodukovaní obmedzujú štandardizáciu serologických testov. Preto boli hľadané biologické inertné častice, ktoré by nahradili červené krvinky u tých serologických vyšetrení, kde partikuly slúžia ako nosič antigénov. V tomto smere ukázali sa vhodné latexové častice. Tieto partikuly sú biologicky neaktívne, chemicky a fyzikálne dosť presne definovateľné, takže je možné štandardizovať ich prípravu na vysokej úrovni. Za vhodného uskladnenia a obmedzenia kontaminácie antiseptikami častice sa nemenia po dlhú dobu a výsledky testu sú reprodukovateľné so suspenziou aj dva roky starou.

Použitie latexovej suspenzie bolo širsko overené pri serologickom zisťovaní makroglobulínov reumatoidného faktoru Singer a kol. (1956), Houb a kol. (1961), v reakcii C — reaktívneho proteínu, antistreptolýzínu O, tzv. Lupus Erythematodes faktoru, antitoxínu difterického a tetanického, v serológii toxoplazmózy, leptospirózy a pod. Kabat a kol. (1965).

Mechанизmus týchto serologických reakcií spočíva vždy v naviazaní vhodného antigénu na latexové častice a v dôkaze protilátok alebo naopak v naviazaní protilátky k dôkazu antigénu.

MATERIÁL A METODIKA

Hyperimunné séra s antigonadotropnou aktivitou sme získali na králikoch rôzneho pohlavia po simultánnom očkovaní farmaceutickým komerčným preparátom Praedyn-Spofa. Schéma dávkovania je na tab. I. Diéta a chov králikov odpovedali bežným laboratorným podmienkam; po vykŕvení králikov získané antigonadotropné séra boli uchované pri 16–20° C s konzervačnou prísadou merthiolátu 0,01 %.

Latexová substancija v podstate predstavuje umelý polymér, ktorý je východzcu látkou pre výrobu kaučuku. Svoje konečné fyzikálne, chemické vlastnosti získava už vulkanizáciou. Je to koloidná disperzia mikroskopických častíc vo vodnom prostredí. Je ľahšia ako voda, špecifickej váhy 0,96–0,98. Veľkosť častíc je u jednotlivých latexov rôzna a pohybuje sa od 0,05–15 μ m. Menšie partikuly sú guľovité, väčšie hruškovite pretiahle. Noble a kol. (1962) cit. K a m a n (1965). Najjemnejšie častice majú latexy chlór-prenové, najhrubšie latexy thiokolu. Podľa koncentrácie častíc sa mení aj väzkosť, takže 30 % latex má konzistenciu mlieka, 60 % konzistenciu smotany, 70–75 % konzistenciu pasty. Jednotlivé častice sú záporne nabité, odpudzujú sa, zabráňujú samovoľnej koagulácii a podmieňujú stabilitu latexu. Podľa spôsobu získavania sú latexy prírodné a syntetické. K a m a n (1965).

Ako latexu k aglutinačnej reakcii sme použili diagnostickú súpravu pre latex-fixačný test, prípravku vyrobeného ÚSOL – Šarišské Michalany. Základná latexová suspenzia polystirenových častíc je riedená a konzervovaná azidom soľným.

TITROVANIE ANTIGONADOTROPNÉHO SÉRA

Pred začiatkom riedenia latexovej suspenzie, táto sa najprv homogenizuje pretrepaním vo fľaštičke, potom sa pripraví pufer zriedením obsahu ampulky ad 400 ml destilovanej vody a upraví pH na 8,2. Koncentrácia glycínu v pufri

I.

Králik č.	Apl. dávka HCG m. j.	Počet injekcií	Celková dávka HCG m. j.	Titer AGS
3	1 500	19	125 000	1 : 6400
	3 500			
	4 500			
	7 500			
	12 000			
4	1 500	19	114 500	1 : 6400
	3 500			
	6 000			
	7 500			
5	12 000	12	144 000	1 : 6400
	12 000			

tohoto zloženia je 0,1 M. Potom si pripravíme rad skúmaviek 1—9 a do každej dáme glycinový pufer. Do prvej skúmavky, druhej a tretej dáme 0,9 ml pufru, do ďalších 0,5 ml. Potom pridávame do prvej skúmavky 0,1 ml hyperimunného séra inaktivovaného 30 min. pri 56° C a po premiešaní preniesieme do druhej skúmavky 0,1 ml, z tejto do tretej 0,1 ml, do ďalšej potom kvadraticky riedime s 0,5 ml. Z deviatej skúmavky 0,5 ml riedenia vyfúkame. Posledná skúmavka desiata je kontrola, v tejto antigonadotropné sérum nahradíme glycinovým pufrom.

Senzibilizovanú suspenziu latexových častíc pripravíme tak, že 1,25 ml základnej latexovej suspenzie riedime s 40 ml glycinového pufru, v ktorom vopred rozpustíme 2 amp. Praedynu po 500 m. j. Tým obdržíme konečnú koncentráciu senzibilizovanej latexovej suspenzie 25 m. j./1 ml. Po premiešaní necháme zmes stáť cez noc v izbovej teplote. Z takto pripravenej testovacej suspenzie pridáme do skúmaviek s riedeným antiserom taktiež aj do kontrolnej skúmavky po 0,5 ml, premiešame a inkubujeme. Inkubovali sme vo vodnom kúpeli jednak pri 56° C po dobu 90 min.; druhý spôsob inkubácie bol 1 hod. 37° C, 1 hod. 5° C, 1 hod. 56° C. Po inkubácii skúmavky sme centrifugovali 1 min. pri 2500 obr./min. a 5 min. pri 3000 obr./min. Výsledky odčítavame pri postrannom osvetlení pootočením a jemným poklepávaním na dno skúmaviek. Pre overenie reprodukovateľnosti testu boli prevedené paralelné riedenia králičích negatívnych sér v glycinovom pufri s pridaním latexových senzibilizovaných partikul. Pre hodnotenie testu boli použité tieto kritéria: reakcia ++ vytvára v skúmavke zrníčkovú aglutináciu s čírym supernatantom.

Reakcia + v skúmavke možno pozorovať zrníčkovú aglutináciu, pričom supernatant je zakalený časticami latexu.

Reakcia +- dáva nejasnú aglutináciu, zvíří sa len obláčik častíc, v ktorom sú jemné aglutináty.

Reakcia negatívna nevytvára žiadnu aglutináciu, zvíří sa iba obláčik latexových častíc.

VÝSLEDKY

Výška titru antigonadotropného séra vo všetkých prípadoch vyšetrovaných vzorkov sér nám dávala pozitívne hodnoty do 6. skúmavky, ktoré odpovedali titru 1 : 6400. Vo vzorku séra tretieho imunizovaného králika sme dostávali v siedmej skúmavke nejasnú aglutináciu, pri poklepe na dno skúmavky zvířil sa iba obláčik latexových partikul. V piatom vzorku v siedmej skúmavke kvadratického riedenia sme pozorovali zrníčkovú aglutináciu, pričom supernatant bol zakalený časticami latexu.

Za konečnú skúmavku v rade sme posudzovali dvojkrížkovú reakciu s jasnou aglutináciou a čírym supernatantom. Výsledky v rutinom prešetrení dávali jednakú výšku aglutinácie, a to ako v prvom i druhom spôsobe inkubácie, tak aj v oboch prípadoch doby a počtu otáčok pri centrifugovaní. Paralelný latex-fixačný test králičích riedení negatívnych sér ako kontrolné skúmavky zmesi pufru a senzibilizovanej latexovej suspenzie, nám nedávali v žiadnom prípade aglutináciu. V oboch prípadoch kontrol sme nepozorovali žiadny kvalitatívny rozdiel skúšky; pri miernom poklepe na dno skúmavky zvířil sa iba obláčik latexových senzibilizovaných partikul (tab. II).

Králik č.	Riedenie antgonadotropného hypermuinného séra									
	1 : 8	:80	:800	:1600	:3200	:6400	:12800	:25600	:51200	kontrola
3	++	++	++	++	++	++	±	—	—	—
4	++	++	++	++	++	++	—	—	—	—
5	++	++	++	++	++	++	+	—	—	—
Normál. král. sérum	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

DISKUSIA

V našom príspevku pokúsili sme sa zistiť možnosť vytitrovania králičieho antgonadotropného hyperimunného séra jednou z doposiaľ málo prepracovaných serologických metodík v endokrinológii, pomocou latex-fixačného testu. Skúšané séra získané po simultánnom očkovaní Praedyncm-Spola sme preverovali niekoľkými serologickými reakciami, ktoré nám prakticky slúžili v nami modifikovanom latexovom teste ako jedna z kontrol správnosti dosiahnutých výsledkov. I t z e a kol. (v tlačí).

Z autorov, ktorí použili tejto latex aglutinačnej reakcie medzi HCG a králičimi protilátkami, priorita patrí R o b b i n s o v i a kol. (1962), ktorý vo svojej experimentálnej práci získal hyperimunné sérum po i. m. simultánnom podávaní 40.000 m. j. HCG v preparáte Antuitrín S emulgovaného vo Freundsovom adjuvane a ako nosiča antigénu použili polystyrenového bacto-latexu (DIFCO). Výsledky ich práce ukázali na možnosť využitia tejto latex-aglutinácie na prípadné určenie HCG resp. gravidity žien. G o s s a kol. (1962) titrujú LH aktivitu pomocou latex-HCG inhibičnej aglutinácie. K tomuto spôsobu prišli po predchádzajúcich určitých ťažkostiach v reprodukovaní metódy W i d e h o a kol. (1960), ktorí pracovali systémom HCG — senzibilizovaných ovčích červených krviniek. G o s s a kol. (1962) pracovali s komerčným latexovým preparátom — O r t h o Pregnancy Test Kit a ich dosiahnuté výsledky dávali malú štatistickú priekaznosť LH hladiny v moči vyššie spomenutou krížovou HCG-LH reakciou. G o l d i n (1962) použil latexových partikul k senzibilizovaniu s HCG v serologickom teste na zistenie gravidity. Autor pracoval s vyššie shodným latexovým preparátom a hladinu HCG určoval v ranných vzorkách moča resp. séra. Z výsledkov tohoto testu vyplýva, že je citlivejší ako biologický test na žabách, ale iba zhodný s biologickým testovaním na infantilných krysích samičkách. Väčšiu spoľahlivosť dávali vzorky moča oproti séru.

Nami dosiahnuté výsledky dávali citlivejšiu odpoveď s porovnaním hemaglutinačno-inhibičným testom a s predchádzajúcim porovnaním vyplýva, že latexová suspenzia odstraňuje nevýhody dosiaľ používaných červených krviniek. Latex-fixačný test je omnoho rýchlejší než hemaglutinačná aglutinácia a šandardnosť aj stabilita latexových častíc zaisťuje omnoho lepšie reprodukovateľnosť výsledkov. Mali sme možnosť overiť s porovnaním literárnych údajov, že latex čs. pôvodu je vhodným substrátom pre kvantitatívne testy typu latex-fixačného testu, pokiaľ vyhovuje veľkosťou častíc, ich disperzitou, stupňom emulgácie a koncentráciou pôvodného monoméru. H o u b a a kol. (1961). Pre titro-

vanie antigonadotropných hyperimunných sér nazdávame sa, že je potom vhodným doplnujúcim kvantitatívnym testom nami už skôr použitých serologických metód, interfaciálnej prstencovej precipitačnej reakcie v tekutom prostredí ako aj dvojitej agarovej precipitácie Ouchterlonyho.

SÚHRN

V našom experimentálnom príspevku použili sme latex-fixačného testu pri titrovaní králičích hyperimunných sér s antigonadotropnou aktivitou. Ako latexu k aglutinačnej reakcii sme použili diagnostickej súpravy, komerčného výrobku ÚSOL — Šarišské Michaľany. Antigonadotropné séra boli vopred titrované serologickými reakciami. V porovnaní s literárnymi údajmi sme si overili, že latex čs. pôvodu je vhodným nosičom antigénov-Praedyu a že vyhovuje pre kvantitatívne aglutinácie latex-fixačného typu. Pre titrovanie sér s antigonadotropnou aktivitou zdá sa byť vhodným doplnujúcim testom nami už skôr použitých serologických metód, interfaciálnej prstencovej precipitačnej reakcie v tekutom prostredí ako aj dvojitej agarovej precipitácie Ouchterlonyho.

Došlo dňa 29. 10. 1965

Literatúra

1. ARENDARČIK J., ITZE L.: Dynamika aktivity hypofyzárnych gonadotropínov (FSH a ICSH) v moči gravidných zvierat. = „Veterinární medicína“, 9, 1, 1964 : 29-34. — 2. ARENDARČIK J., LEHOCKÝ J.: Die hypophysären Gonadotropine (FSH und ICSH) im Harn der Stuten während des oestralen Zyklus. = „Endokrinologie“, 46, 5-6, 1964 : 223-226. — 3. GOLDIN M.: The Use of Latex Particles sensitized with Human Chorionic Gonadotropin in a Serologic Test for Pregnancy. = „Am. J. of Clin. Pathol.“, 38, 3, 1962 : 335-338. — 4. GOSS D. A., TAYMUR M. L.: Measurement of LH Activity by Latex-HCG Agglutination Inhibition. = „Endocrinology“, 71, 2, 1962 : 321-324. — 5. HOUBA V., TESÁREK B.: Srovnání latex-fixačního testu a hemaglutinační reakce u progresivní polyartritidy. = „Fysiatrický věstník“, XXXIX-2, 1961 : 80-85. — 6. ITZE L., ARENDARČIK J., ŠKARDA R.: Investigation of gonadotropic substances in the urine of gravid mares by paper electrophoresis. = „Endokrynologia Polska“, 16, 1965 : 167-176. — 7. ITZE L., ARENDARČIK J.: Imunobiologické štúdium antigonadotropínov. = „Veterinární medicína“. V tlači. — 8. KABAT E. A., MAYER M. M.: Experimentální imunochemie, ČSAV - Praha 1965 : 168. — 9. KAMAAN J.: Výsledky s použitím latexu kaučuku při studiu krevního řečiště. = „Sborník VŠZ v Brně“, 13, 1965, 2 : 151-161. — 10. NOBLE R. J.: Lateks v technice. Převod s anglického. Goschimizdat, Leningrad, 1962. — 11. ROBBINS J. L., HILL G. A., CARLE B. N., CARLQUIST J. H., MARCUS S.: Latex Agglutination Reactions between Human Chorionic Gonadotropin and Rabbit Antibody. = „Proc. Soc. exper. Biol. Med.“, 109, 1962 : 321-325. — 12. SINGER J. M., PLOTZ Ch. M.: The Latex Fixation Test. I. Application to the Serologic Diagnosis of Rheumatoid Arthritis. = „Amer. J. of Med.“, 1956 : 888-892. — 13. SWIERCZYNSKA Z., SAMOCHOWIEC E.: Serological Method of Detecting Choriogonadotropin as a Test for Pregnancy. = „Path. Microbiol.“, 24, 1961 : 67-71. — 14. WIDE L., GEMZELL C. A.: An immunological Pregnancy Test. = „Acta Endocr.“, 35, 1960 : 261-267.

К вопросу изучения антигонадотропной сыворотки при помощи латекс-фиксирующего теста

В нашей экспериментальной статье мы пользовались латекс-фиксирующим тестом при титровании кроличьих гипериммунных сывороток с антигонадотропной активностью. В качестве латекса для агглютинирующей реакции мы применили диагностический препарат,

коммерческого производства УСОЛ — Шаришске Михаланы. Антигонадотропные сыворотки сначала титрировались серологическими реакциями. По сравнению с литературными данными мы установили, что латекс чехословацкого производства является пригодным носителем антигенов — Праедина и что он удовлетворителен для количественной агглютинации латекс-фиксирующего типа. Для титрования сывороток с антигонадотропной активностью представляется пригодным дополнительный тест уже ранее применяемых нами серологических методов, интерфациальной кольцевой преципитационной реакции в живой среде, а также и двойной агаровой преципитации Оухтерлони.

On the Studying of Antinogonadotropical Serum by means of the Latex-Fixation-Test

In our experimental contribution we have used latex-fixation-test when titrating the rabbit hyperimmune sera possessing antinogonadotropical activity. A diagnostic set — a commercial product of the ÚSOЛ Šarišské Michalany (Institute of Sera and Vaccines) was used as latex for the agglutination-reaction. Antinogonadotropical sera were previously titrated by serological reactions. In comparison with literary data we have verified, that latex of Czechoslovak production is a convenient carrier of antigens — Praedyn, being suitable for quantitative agglutinations of latex-fixation type. It seems to be a suitable complementary test to the serological methods we previously used for the titration of sera with antinogonadotropical activity (i. e. of both the interfacial ring precipitation-reaction in liquid medium and the double agar Ouchterlony's precipitation).

Beitrag zum Studium des antinogonadotropen Serums mit Hilfe des Latex-Fixationstestes

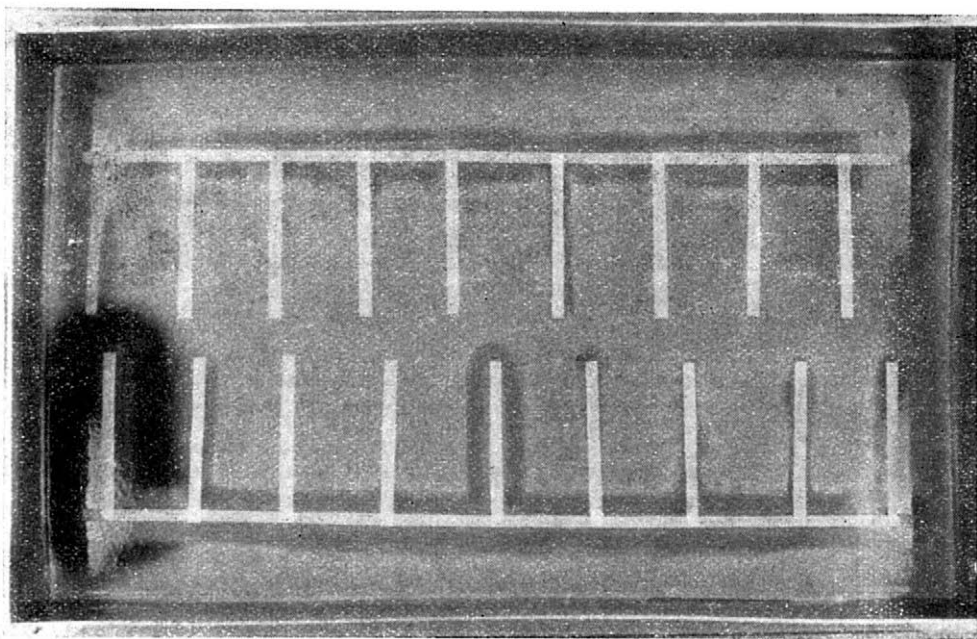
In unserem experimentellen Beitrag benützten wir den Latex-Fixationstest beim Titrieren von hyperimmunen Kaninchenserum mit antinogonadotroper Aktivität. Als Latex zur Agglutinationsreaktion benützten wir ein kommerzielles diagnostisches Präparat aus der Serum- und Arzneierzeugungsanstalt in Šarišské Michalany. Die antinogonadotropen Seren wurden zunächst mit Serologischen Reaktionen titriert. Im Vergleich mit Angaben aus der Literatur stellten wir fest, daß das Latex tschechoslowakischer Herkunft ein geeigneter Träger des Antigene-Praedyns ist und daß es für eine quantitative Agglutination des Latex-Fixationstyps geeignet ist. Zur Titration von Seren mit antinogonadotroper Aktivität scheint es ein geeigneter Ergänzungstest der von uns früher benützten serologischen Testmethoden zu sein, d. h. der interfacialen Ringpräzipitationsreaktion im flüssigen Milieu als auch der doppelten Agarpräzipitationsprobe nach Ouchterlony.

Adresy autorov:

Lubomír Itze, prom. vet. lékař, Doc. MVDr. Jozef Arendarčík, CSc., VŠP, veterinárska fakulta, katedra porovnávacej fyziológie, Košice, Komenského 71

■ Prídavok telluričitanu se v bakteriologickej praxi používa do mnohých diagnostických pôd (R a š k a a k l. 1958) a v laboratórnej diagnostike tuberkulózy sa užíva na vizualizáciu diskrétného rastu kolónií mykobaktérií (Sborník veterinárných predpisů, 1957 a 1962, Š u l a 1947). Při štúdiu oxydoredukčných reakcií niektorých mikroorganizmov (K r č m é r y, G r ú n e r t o v á 1964, H ú š ť a v o v á, K e l l e n, K r č m é r y 1964) nás zaujala skutočnosť, že mnohé patogénne mikroorganizmy redukujú telluričitan na amorfný tellur, ktorý sa ako čierny koloidný povlak vyredukuje na agarových pôdach (obr. 1). Redukčná aktivita niektorých mikroorganizmov závisí od koncentrácie telluričitanu: vysoké koncentrácie brzdia rast mikroorganizmov, ale po poklese koncentrácie pod minimálnu koncentráciu (= MIC) dochádza ihneď k neobyčajne aktívnej redukcii.

V oblasti MIC telluričitanu dochádza teda k určitému skoku a k paradoxnému javu: k veľmi aktívnej redukcii ihneď v blízkosti inhibičnej zóny. To svedčí



Obr. 1

o skutočnosti, že Te^{+4} sa veľmi ochotne zapájajú do oxydoredukčných reakcií mikroorganizmov ako ich nefyziologický substrát. Podobne sú zaujímavé aj redukcie iných nefyziologických substrátov, ako sú nitráty, bizmutitany atď. Tieto redukcie sme študovali i v súvislosti s našim výskumom mechanizmu účinku tetracyklínových antibiotík ako možných nefyziologických pseudokatalyzátorov oxydoredukčných procesov mikroorganizmov (Krčméry, Kellen, Húšťavová — v tlači). Nitroreduktáza *E. coli* (Saz, Martinez 1956) a mykobaktérii (Bönicke 1962) boli v tom smere intenzívne študované.

Keďže bolo dokázané, že u *M. avium* funguje veľmi aktívna telluro-reduktáza (Terai a kol. 1958), skúmali sme, či vysoká aktivita redukcie Te^{+4} nie je v súvislosti s metabolickými zvláštnosťami *M. avium*, ktorými sa tieto mykobaktérie líšia najmä od *M. bovis*. V pozitívnom prípade by sa dala aktivita telluro-reduktázy využiť na biochemickú diferenciáciu *M. avium*.

MATERIÁL A METODIKA

Optimálnou metódou na diferenciáciu *M. avium* pomocou telluro-reduktázy by bolo jej kvantitatívne stanovenie. Bohužiaľ, všetky nami preskúmané metódy, okrem Nermutovej (1963), sa ukázali nevhodné. Keďže však i Nermutova metódika pomocou lauryl-sulfátu vyžaduje špeciálne prístrojové vybavenie, uspokojili sme sa s kvalitatívnym posudzovaním redukcie Te^{+4} na základe princípu „all or none“, čo pre diferenciáciu *M. avium* prichádza koniec-koncov jedine do úvahy.

V súhlase s všeobecnými poznatkami o nízkej endogénnej redukcii telluricitanu baktériami (Nermut 1960), tj. redukcii odpočívajúcimi bunkami (toto tiež svedčí o napojenie Te^{+4} na aktívne prebiehajúce metabolické reakcie), skúmali sme redukcii telluricitanu hlavne počas rastu *M. avium* na tekutej Šulovej pôde.

Aktivitu telluro-reduktázy (= TeR) sme dosiaľ opakovane preskúmali u 32 kmeňov mykobaktérií, z čoho bolo 16 kmeňov *M. avium*, 12 kmeňov *M. bovis* a 4 kmene *M. tuberculosis*.

K 4,5 ml Šulovej pôdy sa pridalo 0,5 ml roztoku telluricitanu (skúmali sme štyri koncentrácie: 1 %, 0,5 %, 0,05 % a 0,01 %; konečná koncentrácia telluricitanu v pôde bola tedy 10krát nižšia). Nato sa pôdy naočkovali jednou kľučkou porastu skúmaného kmeňa na Petragnaniho pôde (porast nebol starší ako 7 týždňov). Po 6 týždňoch inkubácie v tme pri 37° C sme posudzovali výsledky reakcie podľa sčernania narastených buniek v médiu.

U menšieho počtu kmeňov sme študovali ešte dve varianty tohto postupu. Vo variante A, 4,5 ml Šulovej pôdy sa naočkovalo jednou kľučkou a kmeň sa 6 týždňov nechal vyrásť. Nato sa do skúmavky pridal telluricitan (0,5 ml udaných koncentrácií) a skúmavky se inkubovali ďalších 72 hodín, načo sa posudzovala redukcia.

Vo variante B, kmene sa nechali vyrásť na Petragnaniho pôdach, porast sa asepticky zmyl a homogenizoval. Vzniklé emulzie sa upravili zmývacím roztokom na približne rovnakú hustotu (dávala $E = 0,80-0,90$ na spekrofotometri PREMA pri 620 um). Nato sa k 2 ml emulzie mykobaktérií pridalo vždy 0,2 ml roztoku telluricitanu (koncentrácie ako vyššie uvedené). Zmes sa vložila do termostatu na 72 hodín, po čom sa posudzovala redukcia Te^{+4} .

Všetky kmene se robili vždy trojmo so všetkými uvedenými koncentraciemi telluricitanu. U každého kmeňa bola robená trojmo kontrola rastu.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky našich pokusov sú stručne zhrnuté v tabuľke I. Z nej vidieť, že všetky kmene *M. avium* bolo možno spoľahlivo odlišiť najmä od kmeňov *M. bovis*. Kmene *M. avium* veľmi aktívne redukujú telluričitan i v najvyšších použitých koncentráciách. Humánne kmene (pokiaľ to môžeme pozorovať z tak malého počtu kmeňov) redukujú Te^{+4} tiež veľmi aktívne, ale zdá sa, iba v nižších koncentráciách. Kmene *M. bovis* redukujú telluričitan iba výnimočne, a to vo veľmi nízkych koncentráciách.

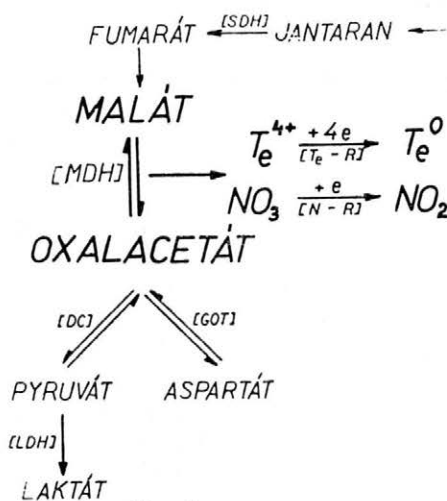
I. Aktivita telluro-redukázy u skúmaných kmeňov mykobaktérií

Typ mykobaktérií	Počet skúm. kmeňov	Koncentrácia telluričitanu			
		1,0%	0,5%	0,05%	0,01
<i>M. tuberculosis</i>	4	—	±	++	+++
<i>M. bovis</i>	12	—	—	—	4 + 8 —
<i>M. avium</i>	16	12 + 4 —	+++	++++	++++

V oboch variantách našich pokusov, A i B, dosiahli sme podstatne horšie výsledky, redukcia nebola ani zďaleka tak aktívna a rozdiely tak zreteľné, ako v hlavných pokusoch. To svedčí o skutočnosti, že optimálne výsledky sa v tomto teste dosahujú vtedy, ak je telluričitan prítomný vo všetkých fázach rastu mykobaktérií.

Výsledky našich skúmaní naznačujú možnosť využitia telluro-reduktázy ako ďalšej metódy na komplexnú biochemickú diferenciáciu *M. avium*, a pri vypracovaní kvantitatívnej metódy, zaiste i iných typov mykobaktérií, najmä tzv. atypických. Uvedené rozdiely TeR v podstate súhlasia s výsledkami redukcie tetrazóliových solí, ako sme ich už publikovali (H o c m a n o v á, K r ě m ě r y 1964). Keďže miesta v bunke, redukujúce Te^{+4} , nie sú totožné s miestami redukujúcimi tetrazólicvé soli (10) možno sa domnievať, že medzi *M. avium* a ostatnými typickými mykobaktériami, najmä *M. bovis*, existujú metabolické rozdiely, zvlášť v aktivite niektorých reduktáz.

Skúmanie TeR u *M. avium* má teda význam nielen z hľadiska ich diferenciácie, ale i pre štúdium charakteru ich metabolizmu. Bolo zistené (T e r a i a kol. 1958), že u *M. avium* je aktivita TeR spojená s aktívnou malikodehydro-



Obr. 2.

genázy (= MDH). Aj iné redukcie nefyziologických substrátov, napr. nitrátov, je u mikroorganizmov, vrátane mykobaktérií (Kimura 1963, Goldman 1950) spojená s aktívnou MDH (Saz, Martinez 1956). Keďže aj v redukcii nitrátov *M. bovis* zaujíma osobitné postavenie medzi mykobaktériami (Bönicke 1962), možno z toho vyvodzovať, že existujú rozdiely v aktivite MDH u jednotlivých typov mykobaktérií. Tento enzým však, ako je to vidieť z obr. 2, je typickou „pacemakerovskou reakciou“, je akoby metabolickou križovatkou, na ktorej sa stretávajú oxydatívny energetický metabolizmus (Krebsov cyklus), anaerobná glykolýza (cestou syntézy laktátu) a syntéza proteínov a nukleových kyselín (MDH produkuje oxálacetát, ktorý je jediným substrátom pre transaminačnú syntézu asparátu, východzej látky pre syntézu ako nukleových kyselín, tak i celého radu aminokyselín).

Možno sa domnievať, že ióny Te^{+4} , ako nefyziologický substrát (podobne i nitrátové ióny), odvádzajú elektróny z aktívnej MDH. Nakoľko pri redukcii Te^{+4} sa jedná o nevratnú štvorelektrónovú redukciu, môže Te^{+4} vyvolať v „biologickom prúdovodiči“, v transfere elektrónov v terminálnej respirácii metabolický skrat (Banna). Elektróny neprechádzajú cez enzýmy terminálnej respirácie (kde sa získava biologická energia) na kyslík, ale priamo z MDM na Te^{+4} .

Mechanizmus inhibičného účinku INH súvisí, ako sa zdá, s transaminačnou aktivitou mykobaktérií, kde môže ísť o kompetíciu s pyridoxálovými koenzýmami (Youtt 1958). Keďže redukcia Te^{+4} je spojená aspoň s jednou transaminačnou reakciou (GOT), je potrebné študovať TeR aj v súvislosti s mechanizmom účinku INH. INH a niektoré iné amidy blokujú transaminázy nielen u mykobaktérií, ale aj iných mikroorganizmov (Hicks 1961). Keďže však INH na tieto mikroorganizmy nemá inhibičný vplyv, je potrebné skúmať metabolické zvláštnosti mykobaktérií aj v súvislosti s priebehom ich transaminačných reakcií. V tejto súvislosti treba upozorniť na zistenia Bönickeho (1958), že niektoré pentaheterocyklické hydrazidy (ktorým pripisuje podobný mechanizmus účinku ako INH), inhibujú selektívne rast *M. bovis*.

Ostáva teda ešte mnoho nevyriešených otázok vo sfére metabolických zvláštností jednotlivých druhov mykobaktérií, ktoré zvláštnosti sú vlastne podkladom možností ich biochemickej laboratórnej diferenciacie.

S U H R N

Za účelom využitia pre diferenciaciu *M. avium* bola skúmaná telluroreduktázová aktivita 16 kmeňov *M. avium*, 12 kmeňov *M. bovis* a 4 kmeňov *M. tuberculosis*. K 4,5 ml šulovej pôdy, inokulovanej jednou klučkou porastu kmeňa na Petraganiho pôde, sa pridalo 0,5 ml roztoku K_2TeO_3 (fy Carlo Erba, Milan) o týchto koncentráciách, 1,0%, 0,5%, 0,05% a 0,01%. Počas 6-týždňovej inkubácie pri 38° C sa vizuálne posudzovalo sčernanie vyrastených buniek. Všetky kmene *M. avium* redukovali Te^{+4} i v najvyšších koncentráciách, kdežto kmene *M. bovis* redukovali Te^{+4} iba sporadicky, a to iba v nízkych koncentráciách. *M. tuberculosis* redukovali telluričitan iba priemerne.

Telluro-reduktáza je u *M. avium* zapojená na aktívnu malikodehydrogenázu. Te^{+4} pôsobia teda ako pseudosubstráty oxydoredukčných reakcií mykobaktérií a odvádzajú elektróny, odovzdávané do respiratory chain, a kyslíku, čím vyvolávajú metabolický skrat. Diskutuje sa o vyzname rozdielov v metabolickej aktivite pre biochemickú diferenciaciu mykobaktérií.

Došlo dňa 19. 8. 1965

Literatúra

- BÖNICKÉ, R.: Derzeitiger Stand der Verfahren zur Differenzierung der verschiedenen Mycobacterium-Arten. = „Ann. Soc. Belge Méd. Trop.“, 4, 1962, s. 403. — 2. BÖNICKÉ, R.: Über die tuberkulostatische Wirksamkeit pentaheterocyclischer Carbonensäurehydrazide. = „Z. Hyg. Infektkr.“, 1958:145, 263. — 3. GOLDMAN, D. S.: Enzyme systems in the mycobacteria. The malic dehydrogenase. = „J. Bact.“, 72, 1956, s. 401. — 4. HICKS, M.: Effect of isoniazid on transaminases and growth of *E. coli*. = „Biochim. Biophys. Acta“, 46, 1961, s. 143. — 5. HOCMANOVÁ, M. - KRČMÉRY, V.: Niektoré metódy biochemickej typizácie boviných a aviárnych mykobaktérií. Amidázový rad a tetrazóliový a ureázový test. = „Rozhl. tuberk.“, 24, 1964, s. 357. — 6. HUŠTAVOVÁ, H. - KELLEN, J. - KRČMÉRY, V.: O mechanizme účinku tetracyklínových antibiotík. 7. Vplyv látok, meniacich redox-potenciál živnej pôdy na antibakteriálnu aktivitu oxytetracyklinu. = „J. Hyg., Microbil. Imunol“, 1965, 9:212. — 7. KIMURA, T.: Activity of malate dehydrogenase from *M. avium*. = „Biochim. Biophys. Acta“ 73, 1963, s. 399. — 8. KRČMÉRY, V. - GRÜNERTOVÁ, H.: On the mechanism of action of tetracycline antibiotics. 5. = „Folia Microbiol.“, 1964, č. 9, s. 222. — 9. KRČMÉRY, V. - KELLEN, J. - HUŠTAVOVÁ, H.: Biochemické mechanizmy antibakteriálneho účinku OTC (J. Hyg., v tlači). — 10. NERMUT M. V.: Über die Reduktion von K_2TeO_3 durch die Bakterienzelle. = „Ztbl. Bakt. I. Orig.“, 1960, 178, 336. — 11. NERMUT, M. V.: Detm. of tellurium in the cells of gram-negative bacteria. = „Folia Microbiol.“, 1963, č. 8, s. 370. — 12. RAŠKA, K. a kol.: Mikrobiologické vyšetrovací metody. Státní zdra. nakl. Praha, 1958. — 13. SAZ, A. K. - MARTINEZ, M. L.: Enzymatic basis of resistance to aureomycin. = „J. Biol. Chem.“, 1956:223-285. — 14. ŠULA, L.: Amer. Rev. Tuberc., 56, 1947, s. 241. — 15. N. N.: Sborník veterinárních předpisů, II. díl. Min. zem., Praha. Pozri tiež: FRESLOVÁ, A., SLÁMOVÁ, J.: = Rozhl. tbc., 17, 1957, s. 135, a 22, 1962. — 16. TERAI, A. a kol.: Tellurite reductase from *M. avium*. = (J. Bact.), 75, 1958, s. 536. — 17. YOUATT, J.: The action of isoniazid on the transaminases of *M. tuberculosis*. = „Biochem. J.“, 68, 158, s. 193.

Использование теллуритовой редуктазы *Mycobacterium avium* для их дифференциации

С целью использования для дифференциации *M. avium* испытывалась теллуроредуктазная активность 16 штаммов *M. avium*, 12 штаммов *M. bovis* и 4 штамма *M. tuberculosis* K 45 мл питательной среды Шюла, инокулированной одним роском штамма на питательной среде Петраняни, добавлялось 0,5 мл раствора K_2TeO_3 (фирмы Carlo Erba, Милан) в следующих концентрациях: 1,0 %, 0,5 %, 0,05 % и 0,01 %. Во время 6-недельной инкубации при 38°С оптически оценивалось почернение выросших клеток. Все штаммы *M. avium* редуцировали Te^{+4} и в самых высоких концентрациях, в то время как штаммы *M. bovis* редуцировали Te^{+4} только спорадически и лишь в низких концентрациях *M. tuberculosis* редуцировали теллурит только умеренно.

Теллуро-редуктаза у *M. avium* реагирует на активную маликодегидрогеназу. Te^{+4} , следовательно, действуют как псевдосубстраты оксидоредукционных реакций микобактерий и отбирают электроны, чем и вызывают метаболическое замыкание. Обсуждается значение различий в метаболической активности для биохимической дифференциации микобактерий.

Utilization of Tellurite Reductase of *Mycobacterium avium* for its Differentiation

With the aim of utilization for the differentiation of *M. avium* the tellurite reductase activity of 16 strains of *M. avium*, 12 strains of *M. bovis*, and 4 strains of *M. tuberculosis* was investigated. 4.5 ml of Šula's medium inoculated by one loop of the grown strain in Petraghiani's medium were enriched with 0.5 ml of the solution K_2TeO_3 (of Carlo Erba, Milano) of these concentrations: 1,0%; 0,5%; 0,05%; and 0,01%. The blackening of the grown cells was judged visually during the 6 weeks' incubation at 38°С. All strains of *M. avium* reduced Te^{+4} even at the highest concentrations, whereas the strains of *M. bovis* reduced Te^{+4} only sporadically, and

that only at low concentrations. The reduction of tellurite by *M. tuberculosis* was only moderate.

The tellurium-reductase is linked up in *M. avium* with active mallicodehydrogenase. So Te^{+4} act as pseudo-substrates of oxidoreducing reactions of mycobacteria and divert the electrons, flowing to the respiratory chain and oxygen, evoking thus a metabolic short circuit. The significance of the differences in the metabolic activity for biochemical differentiation of mycobacteria is being discussed.

Die Anwendung von Tellurit-Reduktase des *Mycobacterium avium* für seine Differenzierung

Zwecks Differenzierung von *Mycobacterium avium* untersuchte man die Tellurit-Reduktase-Aktivität bei 13 Stämmen *M. avium*, 12 Stämmen *M. bovis* und 4 Stämmen *M. tuberculosis*. Zu 4,5 ml des Nährbodens nach Šula, der mit einer Platinschlinge der Kultur des Stammes auf Petragnani-Nährboden inokuliert wurde, wurden 0,5 ml K_2TeO_3 -Lösung (Firma Carlo Erba, Milano) beigesetzt, und zwar in folgenden Konzentrationen: 1,0 ‰, 0,5 ‰, 0,05 ‰ und 0,01 ‰. Während einer 6 Wochen dauernden Inkubation bei 38°C wurde das Schwarzwerden der aufgewachsenen Zellen visuell beurteilt. Sämtliche Stämme des *M. avium* reduzierten das Te^{+4} auch in höchsten Konzentrationen, wogegen Stämme des *M. bovis* das Te^{+4} nur sporadisch, und zwar nur in niedrigen Konzentrationen reduzierten. Die *M. tuberculosis* reduzierten das Tellurit nur mittelmäßig.

Die Telluro-Reduktase ist bei *M. avium* an die aktive Malikodehydrogenase angeschlossen. Das Te^{+4} wirkt demnach als Pseudosubstrat der Oxydo-Reduktions-Reaktionen der Mykobakterien und leiten die für den „respiratory chain“ und Sauerstoff abgegebenen Elektronen ab, wodurch sie einen metabolischen Kurzschluß hervorrufen. Man diskutiert über die Bedeutung der Unterschiede der metabolischen Aktivität für die biochemische Differenzierung von Mykobakterien.

Adresa autorov:

MVDr. Marie Hocmanová, ÚŠVÚ Bratislava, Pri Botanickéj zahrade 3., inž. Vladimír Krčméry, CSc., Ústav hygieny, Bratislava, Ul. čs. armády 40

■ V našem dřívějším sdělení (Churý a Pánek 1964) jsme potvrdili závěry Adle'a a Trainina (1961), že vojtěška z hlediska výživy hospodářských zvířat představuje proměnlivého činitele v reprodukci skotu, protože při jednostranném krmení podstatně ovlivňuje neurohumorální mechanismy její regulace. Ukázali jsme, že pro studium biologických účinků vojtěšky na reprodukci a na orgány a žlázy s reprodukcí související je velmi vhodným modelovým zvířetem morče. Při studiu vlivu jednostranného zkrmování vojtěšky na uvedené orgány vznikla otázka, je-li tento účinek podmíněn jen estrogenně aktivními látkami, nebo zda je složitější a komplexnější povahy. Až dosud je v literatuře, která se těmito problémy zabývá, vesměs zdůrazňován jen účinek estrogenních látek a možný vliv jiných složek je zanedbáván. Dosavadní výsledky výzkumu fytoestrogénů však ukazují, že lze jen s obtížemi vysvětlit jejich rozdílné biologické působení u různých druhů zvířat bez přihlédnutí k jiným biologicky aktivním složkám v krmivu.

MATERIÁL A METODIKA

K pokusům bylo použito 47 morčecích samiček, rozdělených na skupinu kontrolní (21 zvířat) a pokusnou (26 zvířat). Tyto skupiny byly rozděleny na podskupiny podle jednotlivých krmných údobí. Pokusné samičky byly krmeny jen vojtěškou, čerstvě požatou, rostoucí na území veterinární fakulty na mírně alkalické půdě. Kontrolní samičky byly krmeny směsí trav (lipnice luční, srha říznačka) s příměsí smetánky lékařské. Lipnice a srha byly použity z důvodů, že podle údajů Engleho (1957) a Legga (1950) i Dohana a spol. (1951) jsou tyto rostliny relativně málo estrogenní. Množství spotřebovaného krmiva bylo určováno vážením zbytků v odpoledních hodinách. Průměrná spotřeba krmiva u kontrolních a pokusných morčat obnášela 170 gr na zvíře a den.

Pokusy byly rozvrženy na tři krmná údobí, a to: I. údobí od 11. května do 8. června 1964, II. údobí od 8. června do 6. července 1964 a III. údobí od 6. července do 3. srpna 1964.

Abychom mohli porovnávat změny biologického působení jednostranného zkrmování vojtěšky v uvedených údobích byla v každém údobí část samiček krmena 14 dní a druhá část celých 28 dní. Po uplynutí krmného údobí byly kontrolní a pokusné samičky usmrceny a vypreparovány hypofýzy, cvaria, utery a nadledvinky. Jednotlivé orgány byly fixovány v Bouinově fixační směsi stejně dlouho a pak váženy. Ovaria a utery byly zpracovány histologicky. Na obar-

vených řezech, silných 6 mí, byl sledován stupeň rozvoje Grafových folikulů, počet žlutých tělísek, jejich stupeň vývoje, stav vajíček ve folikulech, pokud jde o struktura jádra, a dále byl sledován výskyt folikulárních cyst. Na řezech uterem byl sledován především stav endometria, výška epitelu, rozvoj žlázek a případný výskyt cystické hyperplasie endometria.

V některých případech byl jeden vaječník zpracován bez předchozí fixace tak, že folikuly byly nabídnány jehlou a ve vyteklé tekutině hledána vajíčka a pozorována mikroskopem s fázovým kontrastem. Byl sledován vzhled vajíček, struktura jádra a případné deformace tvaru vajíčka.

Během jednotlivých krmných období byly kontrolní a pokusné samičky váženy v pravidelných týdenních intervalech, aby byl možný přepočítání váhy sledovaných orgánů na stejnou tělesnou váhu, a dále proto, že v předchozích pokusech (Churý a Pánek 1964) jsme pozorovali váhové úbytky pokusných zvířat.

Ve zkrmované vojtěšce byla sledována estrogenní aktivita po celou dobu pokusu, a to jednak metodou podle Schoopa a Kletteho (1952), jednak metodou podle Bickoffa a spol. (1959, 1960). Estrogenní aktivita byla sledována proto, abychom mohli porovnávat zjištěné změny na sledovaných orgánech, zejména ovariu a uteru s obsahem estrogenně aktivních látek v tom kterém zkrmovacím údobí. Kromě estrogenní aktivity byla v některých údobích sledována i antiestrogenní účinnost zkrmované vojtěšky postupem podle Adlera (1962).

VÝSLEDKY POKUSŮ

a) VLIV ZKRMOVÁNÍ VOJTĚSKY NA RŮST

Morčata krmená jednostranně vojtěškou přibývala dobře na váze. V jednotlivých krmných údobích byly sice váhové přírůstky různé intenzity, avšak na rozdíl od výsledků pokusů z roku 1963 jsme v této sérii pokusů brzdění růstu nezaznamenali. Růst kontrol a pokusů byl nejvíce stilumován v květnu a v první polovině června. Přehledně jsou růstové poměry u kontrolních a pokusných samic uvedeny v tabulce I.

I.

Zkrmovací údobí		Kontrolní morčata	Přírůstek v g	Pokusná morčata	Přírůstek v g
I	začátek 11. 5.	239 ± 5	—	239 ± 6	—
	polovina	303 ± 6	+64	322 ± 8	+83
	konec 8. 6.	370 ± 11	+131	345 ± 10	+106
II	začátek 8. 6.	331 ± 15	—	327 ± 9	—
	polovina	348 ± 19	+17	382 ± 20	+55
	konec 6. 7.	395 ± 10	+64	410 ± 20	+83
III	začátek 6. 7.	469 ± 20	—	466 ± 20	—
	polovina	495 ± 30	+26	477 ± 15	+11
	konec 3. 8.	510 ± 20	+41	502 ± 15	+36

Z dat uvedených v tabulce plyne, že stimulační vliv krmení nebyl po celou dobu pokusu konstantní, nýbrž proměnlivý a že se u obou skupin lišil intenzitou.

b) VLIV ZKRMOVÁNÍ VOJTĚŠKY NA VÁHU OVARIA, HYPOFÝZY, UTERU A NADLEDVINKY

Váha hypofýzy, ovaria a nadledvinky vykazovala jak u kontrolních, tak u pokusných samic během jednotlivých krmných údobí, změny souborně uvedené na grafu 1.

U kontrolních zvířat byla nejnížší váha hypofýzy zjištěna 8. června a 6. července, ovaria 6. července a nadledvinky 20. července.

U pokusných morčat byla nejnížší váha hypofýzy zaznamenána 6. července, ovaria 22. června a 20. července, nadledvinky 8. června. Váha uvedených orgánů byla celkem vyrovnaná a nevykazovala velikou variabilitu.

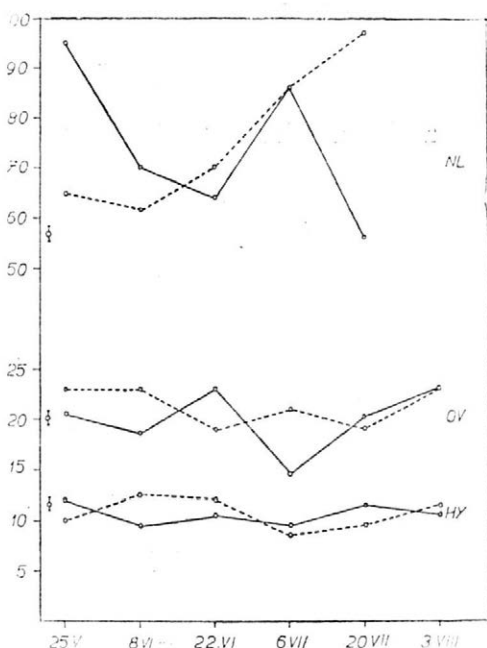
U uterů byla naopak pozorována značná variabilita váhy. Také u tohoto orgánu bylo pozorováno značné kolísání váhy (průměrné), při čemž byl zřetelný rozdíl chování váhy tohoto orgánu u kontrol a pokusů (tabulka II).

Reakce uterů, pokud jde o velikost a barvu, byla u jednotlivých samic jak kontrolní, tak pokusné řady značně individuální, u kontrolních samic byla však reakce vyrovnanější.

c) HISTOLOGICKÉ ZMĚNY V OVARIÍCH

U kontrolních samic byl histologický obraz ovarii celkem po celou pokusnou dobu normální. Výjimkou byl nález u jedné samice 8. června a u poloviny samic 30. srpna, jejichž ovaria obsahovala cysty různé velikosti. 25. května, 22. června a 3. srpna vykazovala ovaria kontrolních samic zřetelné známky stimulace ovaria adenohipofýzou, 6. července naopak byly na preparátech ovarii vesměs známky útlumu ovariální funkce.

Ovaria pokusných samic krmených jen vojtěškou vykazovala odlišný obraz. 8. června a 22. července byly zřetelné známky útlumu ovariální funkce. 25. května, 6. července a 3. srpna byl zřetelný stimulační vliv adenohipofýzy. 8. června a 22. června nebyla v ovarii pokusných samic přítomna žlutá tělíska. Charakteristické bylo, že ovaria pokusných samic obsahovala po celou dobu pokusu folikulární cysty. Jejich velikost a počet byly proměnlivé a u různých



Graf 1. Změny váhy hypofýzy (HY), ovaria (OV) a nadledvinky (NL) morčecích samic krmených vojtěškou (přerušovaná čára), směsí trav (plná čára). Abscisa: data sledování váhy orgánů, ordinata: váha orgánů v mg na 300 gr váhy těla. Kružky ohraničené úsečkou udávají počáteční váhu sledovaných orgánů ke dni 11. V. 64.

Doba	Váha uteru kontrol mg	Váha uteru pokusů mg
25. 5.	560 ± 70	674 ± 100
8. 6.	757 ± 100	530 ± 120
22. 6.	484 ± 100	464 ± 120
6. 7.	657 ± 120	694 ± 130
20. 7.	707 ± 150	518 ± 100
3. 8.	560 ± 120	430 ± 80

ných samic různých. Nejvíce folikulárních cyst bylo zjištěno u samic 22. června, nejméně cyst obsahovaly vaječníky pokusných samic 6. července.

Vzhled histologických preparátů ovaria kontrol a pokusů podává obrázek 2 a 3 křídové přílohy.

d) ZMĚNA STRUKTURY VAJÍČEK

U kontrolních morčat byla nabodnutím zralých Graafových folikulů získána prakticky normální vajíčka. Rovněž na histologických řezech ovarii byla zjišťována pravidelně normální vajíčka.

U pokusných morčat byla po nabodnutí zralých folikulů získána normální vajíčka a vajíčka se zbobtnalým jádrem, deformovaného tvaru. Přibližně značné množství poškozených vajíček obsahovaly folikuly 8. června. Takto změněná vajíčka byla zjištěna i ve folikulech histologických preparátů ovarii pokusných zvířat. Vzhled byl shodný s oním, který jsme popsali v naší dřívější práci (Churý a Pánek 1964).

e) ZMĚNY ENDOMETRIA

Histologické preparáty uterů kontrolních samic vykazovaly v I. krmném údobí vliv progesteronu. Endometrium bylo ve fázi sekreční, žlásky byly dobře vyvinuty. Ve druhém a třetím krmném údobí bylo endometrium ve fázi proliferací. Epitel byl cylindrický, vysoký. Koncem třetí zkrmovací etapy se v některých preparátech objevovaly drobné cysty v endometriu.

U pokusných samic krmných výhradně vojtěškou bylo endometrium převážně ve fázi proliferací a pouze v několika případech ve fázi sekreční. Histologický obraz svědčil o regresivním charakteru sekreční fáze. Epitel byl vesměs vysoký, cylindrický.

8. června, 22. června a 6. července byly v endometriu pokusných samic drobné cysty, jejichž počet i velikost byly proměnlivé.

Typický nálezn v endometriu kontrolních a pokusných samic podává obrázek 4 a 5 křídové přílohy.

f) ESTROGÉNNÍ AKTIVITA

Celkové množství estrogénně aktivních látek izolovaných metodou podle Schoopa a Kletteho (1952) vykazovalo značné rozdíly v jednotlivých krmných etapách. Maximum bylo zjištěno v první polovině druhé krmné etapy 15. června. V první krmné etapě připadalo maximum estrogénních látek na

30. květen, ve třetí etapě na 20. červenec. Nejmenší celkové množství estrogeně aktivních látek bylo zjištěno 8. června a 4. července. Estrogenní aktivita byla nejvyšší 24. června ve druhém krmeném období, 30. května v prvním krmeném období a 20. července ve třetím krmeném období. Celkovému obsahu estrogenních látek izolovaných uvedenou metodou nebyla proporcionální. Na základě výsledků estrogenové titrace lze předpokládat, že v I. krmené etapě zkonsumovaly pokusné samičky cca 10 μ gr estradiolu ekvivalentní množství estrogenů, ve II. etapě asi 17 μ gr a ve třetí etapě asi 14 μ gr ES ekvivalentní množství.

DISKUSE

Výsledky potvrzují naše dřívější zjištění, že jednostranné zkrmování vojtek vyvolává folikulární cysty (Churý a Pánek 1964) a potvrzuje rovněž naše dřívější nálezy (Churý a Črha 1964), že je provázáno poruchou struktury vajíčka. Na rozdíl od pokusů z roku 1963 jsme v těchto pokusech nepozorovali brzdivý vliv vojtečky na růst. Je možné, že tento rozdíl lze vysvětlit nižší estrogenní aktivitou, nebo chyběním látek, interferujících s růstovým faktorem, prokázaným ve vojtěšce Luizou a spol. (1960). Výsledky našich pokusů potvrzují znovu nálezy Adlera a Trainina (1961), že zkrmování vojtečky vyvolává cysty. Tento účinek vojtečky vysvětlují Adler a Trainin (1961) přítomností estrogeně aktivních látek ve vojtěšce. Pro tento předpoklad mluví i údaje Curnowa a spol. (1948), že 28denní zkrmování rostliny obsahující fytoestrogeny vyvolává cystickou hyperplasiu endometria u morčat. Na základě přepočtu údajů uváděných Curnowem a spol. lze počítat s tím, že u morčete vyvolává cystickou hyperplasiu endometria již dávka 3 μ gr estradiolu. Vycházíme-li z těchto dat lze shodně s Adlerem a Traininem považovat za příčinu cystických změn estrogeny vojtečky, protože v našem případě je jejich množství dostačující k vyvolání cystické hyperplasie. Obtížnější je však vysvětlení váhových změn uteru, ovaria a hypofýzy. Změny váhy těchto orgánů neodpovídají totiž plně změnám estrogenní aktivity vojtečky v tom kterém období. Kolísání váhy uteru popsal již dříve po zkrmování estrogeny obsahující rostliny Bennets (1951) u ovcí, avšak nijak blíže tento jev nevysvětlil. V novější době poukazuje na tuto skutečnost Moule (1964), avšak ani on nepodává bližší vysvětlení. Nejjednodušší objasnění změn váhy uvedených orgánů by bylo v tom, že obráží změny estrogenní aktivity během vegetační doby rostliny. Toto vysvětlení by však bylo poměrně jednoduché jen za předpokladu, že by zkrmovaná rostlina obsahovala jen estrogeně aktivní látky. Protože celkové množství estrogeně aktivních látek není proporcionální estrogenní aktivitě, není uvedený vysvětlení váhových změn možné bez přihlédnutí k jiným složkám, přítomným ve zkrmované rostlině. Adler (1961, 1962) prokázal, že vojtěška obsahuje antiestrogeně aktivní látky. Naše pokusy (Churý 1965) ukázaly, že v některých případech zkrmování vojtečky podstatně ovlivňuje odpověď hypofýzy a ovaria na podávaný estrogen, což podporuje názor Adlera. Předpokládáme proto, že změny váhy hypofýzy, ovaria a uteru lze vysvětlit vzájemným poměrem estrogeně aktivních látek a antiestrogeně aktivních látek v tom kterém období zkrmování vojtečky. Posouzení biologického účinku zkrmované rostliny na fertilitu bude proto možné jen v případě, že bude brán v úvahu nejen estrogeně účinek zkrmované rostliny, ale též účinek antiestrogení, případně tlumivý na působení estrogenů a zejména vzájemný poměr těchto antagonisticky působících látek v té které době růstu a zkrmování.

Na 26 morčecích samičkách byl sledován vliv zkrmování vojtěšky a na 21 samičkách vliv zkrmování směsi trav (*Poa pratensis*, *Dactylis glomerata* a *Taraxacum officinale*) na váhové změny ovaria, hypofýzy, uteru a nadledvinky a na histologické změny v ovariu a endometriu. Uvedené rostliny byly zkrmovány ve třech etapách, a to: I. od 11. V. do 8. VI. 64, II. od 8. VI. do 6. VII. 64, III. od 6. VII. do 3. VIII. 64. Váhové změny a histologické změny byly srovnávány se změnami estrogénní aktivity vojtěšky v jednotlivých zkrmovacích údobích. Změny váhy hypofýzy, ovaria a uteru neodpovídaly zcela změnám celkového obsahu estrogénních látek a estrogénní aktivity vojtěšky. U zvířat krmených vojtěškou byly v ováriích přítomny folikulární cysty během celého pokusného údobí, v endometriu byla 8. a 22. června a 6. července zjištěna cystická hyperplasie endometria. Ovaria jevila 8. a 22. června známky útlumu ovariální činnosti a neobsahovala žlutá tělíska. V Graafových folikulech byla u některých samiček zjištěna vajíčka se zlobtnalým jádrem a deformací tvaru. U kontrolních samiček nebyla pozorována poškozená vajíčka ani cystická hyperplasie endometria. U 50 % samiček ve třetím zkrmovacím údobí byla zjištěna 3. srpna přítomnost folikulárních cyst. Ovaria obsahovala během celého pokusného údobí žlutá tělíska. Folikulární cysty a cystická hyperplasie endometria morčat krmených vojtěškou souvisí s estrogény v této rostlině. Změny váhy hypofýzy, uteru a ovaria jsou pravděpodobně výsledkem vzájemného působení estrogénních látek a anti-estrogénů, jejichž výskyt ve vojtěšce byl prokázán Adlerem (1961, 1962). Výsledky ukazují, že jednostranné krmení narušuje více mechanismy, jimiž je řízena činnost hypofýzy, ovaria a nadledvinky a váha uteru, než krmení směsí rostlin.

Došlo dne 23. 9. 1965

Literatura

- ADLER J. H.: Anti-oestrogenic Activity in Alfalfa. = „Vet. Rec.“ 74, No. 43, 1962, 1148-1150. — ADLER J. H., TRANIN D.: The Apparent Effect of Alfalfa on the Reproductive Performance of Dairy Cattle. = IVth. Congr. Anim. Reprod. Hague, 1961, Vol. III, 451. — BENNETS H. W., UNDERWOOD E. J.: The oestrogenic effects of Subterranean clover. = „Austr. J. exper. Biol. med. Sci.“ 1951, 29, 249-253. — BICKOFF E. M. a spol.: Determination of estrogenic activity in fresh and dried forage. = „J. Anim. Sci.“ 1959, 18, 1001. — BICKOFF E. M. a spol.: Observations on the effect of drying on estrogenic activity of alfalfa samples of varying maturity. = „J. Anim. Sci.“ 1960, 19, 745. — CURNOW D. H., ROBINSON T. J., UNDERWOOD E. J.: Estrogenic action of extracts from Subterranean clover. = „Austr. J. exper. Biol., Med. Sci.“ 1948, 26, 171. — DOHAN F. C. a spol.: The estrogenic effects of extracts of Spring Rye Grass and Clover. = „JAVMA“ 1951, 118, 323. — ENGLE P. H., BELL D. S., DAVIS R. R.: The effect of ladino clover, birdsfoot trefoil and blue grass pasture on the rate of conception among ewes. = „J. Anim. Sci.“ 1957, 16, 703. — CHURÝ J.: Vliv zkrmování vojtěšky na váhové změny uteru, ovaria a hypofýzy po aplikaci estradiolbenzoátu. = „Vet. Med.“ 1965, 4, 241-246. — CHURÝ J., CRHA J.: Über den Einfluß von Luzerne-Fütterung auf die Ovulation und Ei-Struktur beim Kaninchen. V. Congr. über Tierische Fortpflanzung und künstl. Bes. Trento, Vol. II. 1964, 123-126. — CHURÝ J., PÁNEK K.: Vliv jednostranného krmení vojtěškou na ovarium a uterus. „Vet. Med.“ 1964, No. 2, 99-108. — LEGG S. P.: The seasonal and species distribution of estrogens in british pasture plants. „Biochem. J.“ 1950, 46, 19. — MOULE G. R.: Problems arising out of estrogenic pastures in Australia. V. Congr. Anim. reprod., insem. Trento, 1964, Vol. VII, 339-343. — SCHOOP G., KLETTE H.: Gehäufte Sterilität durch östrogene Stoffe im Weidegras. II. Internat. Congr. Physiol. und Pathol. der Reprod. 1952.

Влияние одностороннего кормления люцерной на гипофиз, яичники, матку и надпочечник морской свинки

На 26 самках морских свинок изучалось влияние скармливания люцерны, а на 21 самке — влияние скармливания травосмесей (*Poa pratensis*, *Dactylis glomerata* и *Taraxacum officinale*) на изменение веса яичников, гипофиза, матки и надпочечника, а также на гистологические изменения яичников и эндометрия. Приведенные растения скармливались в трех этапах: I — от 11. V. до 8. VI. 64 г., II — от 8. VI. до 6. VII. 64 г., III — от 6. VII. до 3. VIII. 64 г. Весовые и гистологические изменения сравнивались с изменениями эстрогенной активности люцерны в отдельные периоды скармливания. Изменения веса гипофиза, яичника и матки не отвечали полностью изменениям общего содержания эстрогенных веществ и эстрогенной активности люцерны. В яичниках у кормленных люцерной животных были обнаружены фолликулярные кисты в течение всего опытного периода, в эндометрии была 8 и 22 июня и 6 июля обнаружена кистозная гиперплазия эндометрия. Яичники 8 и 22 июня начали проявлять признаки подавления своего действия и не содержали желтого тела. В Гравовых фолликулах у некоторых самок были обнаружены яичники с набухшим ядром и с деформацией. У контрольных самок не было обнаружено повреждений ни яичек, ни кистозной гиперплазии эндометрия. У 50 % самок 3 августа в III период скармливания были установлены фолликулярные кисты. В яичниках на протяжении всего периода скармливания содержалось желтое тело. Фолликулярные кисты и кистозная гиперплазия эндометрия морских свинок, кормленных люцерной, находятся в связи с эстрогенами этого растения. Изменения веса гипофиза, матки и яичников являются, очевидно, результатом взаимодействия эстрогенных веществ и антиэстрогенов, наличие которых в люцерне было доказано Адлером (1961, 1962 гг.). Результаты показывают, что одностороннее кормление нарушает механизмы управления деятельностью гипофиза, яичников и надпочечника, а также весом матки в большей мере, чем кормление смесями растений.

Influence of One-Sided Lucerne Feeding on Hypophysis, Ovaries, Uterus, and Suprarenal Glands of Guinea-Pigs

The influence of lucerne feeding was traced in 26 guinea-pig females, and the influence of feeding a grass-mixture (*Poa pratensis*, *Dactylis glomerata*, and *Taraxacum officinale*) in 21 females, on the weight-changes of ovary, hypophysis, uterus, and suprarenal glands and on histological changes in ovary and endometrium as well. The above mentioned plants were fed in three stages, as follows: I. From 11. 5. to 8. 6. 64, II. From 8. 6. to 6. 7. 64, III. From 6. 7. to 3. 8. 64. The weight- and histological changes were compared with the changes of the estrogenic activity of lucerne in different feeding-periods. The weight-changes of hypophysis, ovary and uterus did not quite correspond to the changes of the total contents of estrogenic substances and the estrogenic activity of lucerne. In animals fed on lucerne there were present follicular cysts in ovaries during the whole experimental period, and cystic hyperplasia of endometrium was ascertained on the 8th and 22nd June and on the 6th of July. On the 8th and on the 22nd June the ovaries revealed signs of depression of ovarian activity and did not contain yellow bodies. In some females ova with swollen nucleus were ascertained in Graaf's follicles showing shape-deformations. In the control females neither any damaged ova nor cystic hyperplasia of endometrium were observed. On the 3rd of August the presence of follicular cysts was ascertained in 50 % of females in the third feeding-period. Their ovaries contained yellow bodies during the whole experimental period. The follicular cysts and cystic hyperplasia of endometrium in the guinea-pigs fed on lucerne are associated with the estrogenic substances in this plant. The weight-changes of hypophysis, uterus and ovary are probably the result of the mutual affecting of estrogenic and antiestrogenic substances; their occurrence in lucerne was demonstrated by Adler (1961, 1962). The results show, that the mechanism controlling the activity of hypophysis, ovary and suprarenal glands and the weight of uterus, is disturbed more by one-sided feeding than by the feeding of plant-mixtures.

Einfluß der einseitigen Verfütterung von Luzerne auf die Hypophyse, Ovarien, den Uterus und auf die Nebenniere des Meerschweinchens

An 26 Meerschweinchen weiblichen Geschlechtes verfolgte man den Einfluß der Verfütterung von Luzerne und an 21 Tieren desselben Geschlechtes den Einfluß der Verfütterung einer Grasmischung (*Poa pratensis*, *Dactylis glomerata* und Tara-

xacum officinale) auf die Gewichtsänderungen der Ovarien, der Hypophyse, des Uterus und der Nebenniere und auf die histologischen Änderungen im Ovarium und Endometrium. Die angeführten Pflanzen wurden in drei Etappen verfüttert, und zwar: I. vom 11. 5. bis 8. 6. 1964, II. vom 8. 6. bis 6. 7. 1964, III. vom 6. 7. bis 3. 8. 1964. Die Gewichts- und histologischen Änderungen wurden mit den Änderungen der Östrogen-Aktivität der Luzerne während der einzelnen Verfütterungsperioden verglichen. Änderungen des Hypophysen-, Ovarien- und Uterusgewichtes entsprachen nicht vollkommen den Änderungen des Gesamtgehaltes an östrogenen Stoffen und der östrogenen Aktivität der Luzerne. Bei den mit Luzerne gefütterten Tieren waren in den Ovarien Follikularzysten während der gesamten Versuchsperiode anwesend; im Endometrium fand man am 8. und 22. Juni und am 6. Juli eine zystische Hyperplasie des Endometriums. Die Ovarien zeigten am 8. und 22. Juni Merkmale einer Hemmung der Ovarialtätigkeit und enthielten keine Gelbkörper. In den Graaf'schen Follikeln wurden bei einigen Weibchen deformierte Eier mit angeschwollenem Kern festgestellt. Bei Kontrolltieren wurden weder beschädigte Eier noch zystische Hyperplasie des Endometriums beobachtet. Bei 50 % der weiblichen Individuen während der III. Verfütterungsperiode wurden am 3. August Follikularzysten ermittelt. Die Ovarien enthielten während der gesamten Versuchsperiode Gelbkörper. Die Follikularzysten und die zystische Hyperplasie des Endometriums bei den mit Luzerne gefütterten Meerschweinchen hängt mit den in dieser Pflanze enthaltenen Östrogenen zusammen. Änderungen des Hypophysen-, Uterus- und Ovariengewichtes sind wahrscheinlich ein Resultat der gegenseitigen Wirkung der Östrogen-Stoffe und der Antiöstrogene, deren Vorkommen in der Luzerne von Adler (1961, 1962) nachgewiesen wurde. Die Ergebnisse zeigen, daß eine einseitige Fütterung diejenigen Mechanismen in höherem Maße stört, durch die die Hypophysen-, Ovarien- und Nebennierentätigkeit und das Uterusgewicht geregelt wird, als es bei der Verfütterung von Pflanzengemisch der Fall ist.

Adresa autorů:

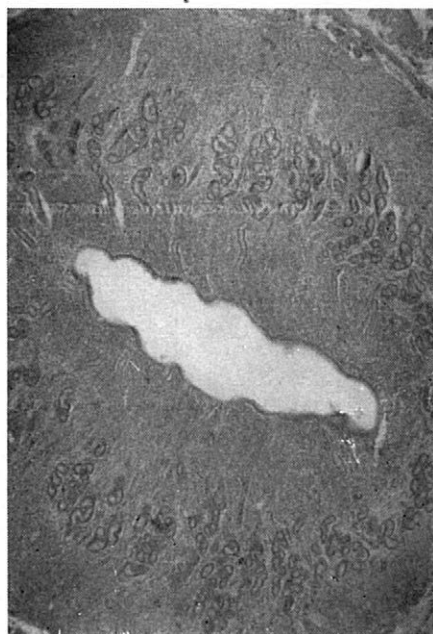
Prof. MUDr. Jiří Churý, CSc., MVDr. Karel Pánek, VŠZ, veterinární fakulta, katedra všeobecné biologie, zoologie a základů genetiky, Brno, Palackého 1-3



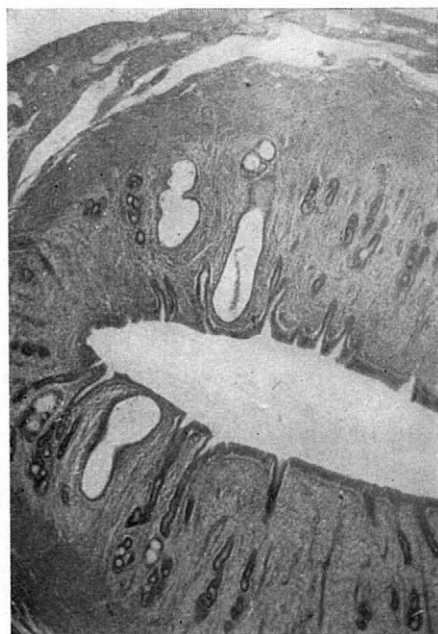
Obr. 2. Histologický obraz ovaria kontrolních morčecích samic. Haematoxylin-eosin.



Obr. 3. Histologický obraz ovaria pokusných samic. Haematoxylin-eosin.

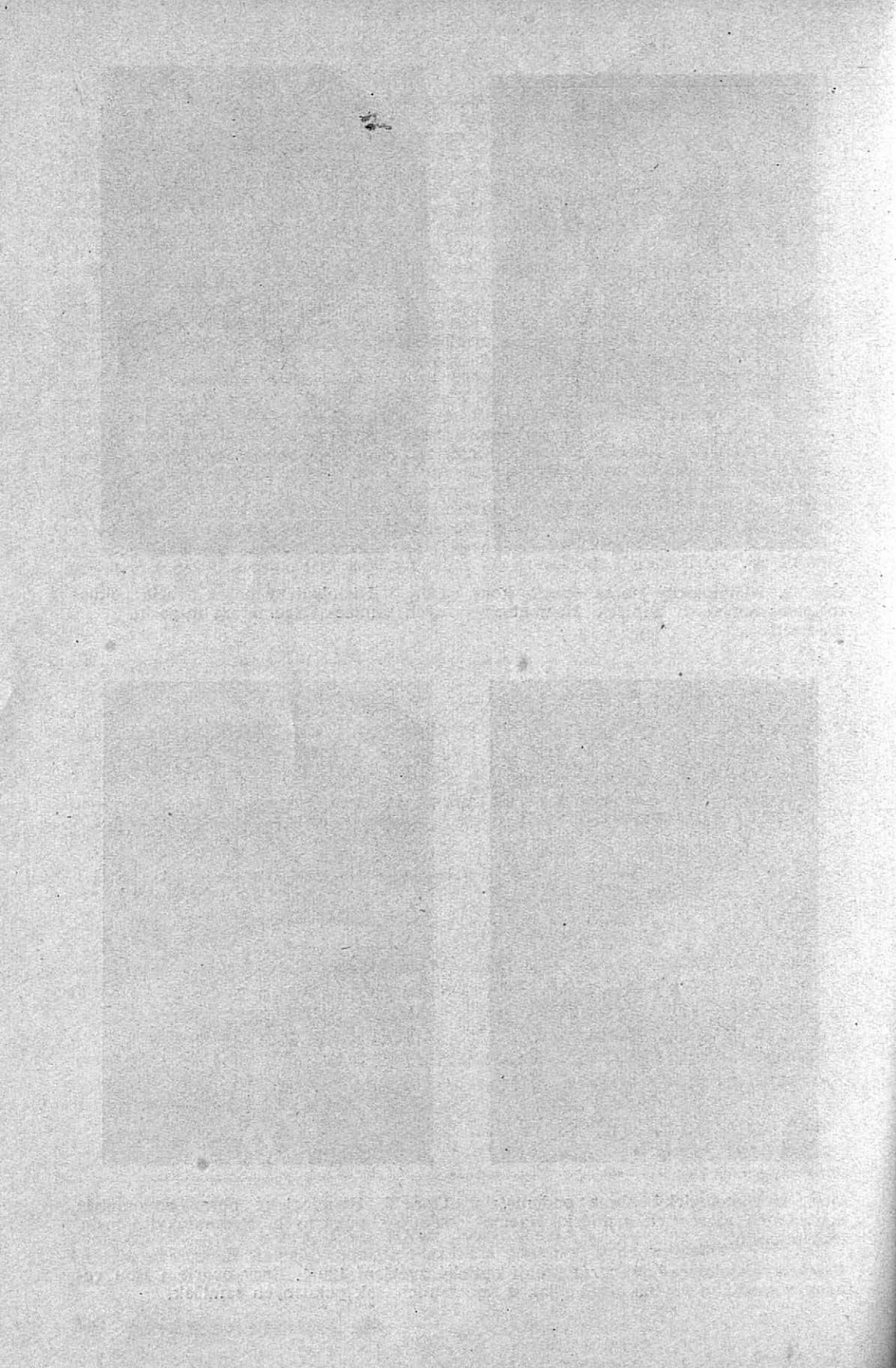


Obr. 4. Histologický obraz endometria kontrolních morčecích samic. Haematoxylin-eosin.



Obr. 5. Histologický obraz endometria samic pokusných. Haematoxylin-eosin.

Všechny histologické preparáty mají optické zvětšení 120X. Řezy ovariem jsou vedeny v mediální rovině orgánu jak u kontrolních, tak pokusných samic.



■ Pokusy o získání bezmikrobních (germfree, GF) rostlin a zvířat, jako jednoho ze stupňů čistoty (izolace) biologického materiálu, se datují od dob Pasteurových. V posledních 15 letech se využívání techniky GF výzkumu natolik rozvinulo zejména ve Spojených státech, dále ve Švédsku, Anglii a Japonsku, že vedle výzkumných středisek byla vybudována, na příklad ve Spojených státech; řada farem, produkujících komerčně tento typ laboratorních zvířat. V posledních letech byl založen GF výzkum spolu s produkcí zvířat o známém stupni mikrobiologické čistoty (gnotobiotů) v Belgii, Francii a v Německu. V Československu se na vytvoření bezmikrobních zvířat a jejich experimentálním využití pracuje od r. 1957. Předmětem zájmu byla především selata v souvislosti s jejich potřebou pro imunologický výzkum. V současné době se rozpracovává technika GF výzkumu na malých laboratorních zvířatech, jako jsou krysy, myši a kuřata.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Při studiu problematiky chovu GF zvířat jsme vycházeli z prací autorů, kteří s úspěchem vyřešili techniku chovu GF zvířat a gnotobiotů a zejména v oblasti fyziologie, biologie a patologie vyřešili na těchto zvířatech řadu teoretických a praktických problémů. Reyniers (1955) podal stručný přehled o metodách chovu gnotobiotů a o historickém vývoji tohoto vědního odvětví. New York Academy of Sciences (Kolektiv autorů 1959) vydala soubor prací autorů, podchycující v podstatě vše, co bylo do té doby vykonáno v oblasti techniky získání, chovu a výživy GF zvířat. Je tu popsána charakteristika germfree (bezmikrobních) a diseasefree (nemoci prostých, bezpatogenních) zvířat a další práce ukazují směry využití GF obratlovců ve výzkumu. Luckey (1963) v literárně bohatě dokumentované publikaci podal podrobný přehled poznatků o germfree životě a gnotobiologii. Zabývá se teorií a obecnými aspekty GF života a gnotobiologie, vývojem GF výzkumu, technikou chovu GF zvířat, jejich výživou a charakteristikou spolu s charakteristikou dalších typů gnotobiotů.

Nuttal a Thierfelder (1897) se první pokusili odchovat bezmikrobní (GF) kuřata. Ukázali, že kuřecí embryo je sterilní, i když skořápka sterilní není. Schottelius (1899) toto potvrdil a po účinné dezinfekci povrchu vajíček získal sterilní kuřata. Řešil na kuřatech problém, zda je možný život bez bakterií. Schotteliová technika byla správná, ale tehdejší úroveň znalostí výživy kuřat nemohla vést k úspěchu. Bezmikrobní kuřata nerostla v důsledku nedostatečné diety a destrukce vitamínů sterilizací za horka. Cohendy (1912)

dosáhl růstu u GF kuřat a mohl prohlásit, že život bez mikrobů je u kuřat za určitých podmínek možný. Naito aj. (1936) vyvinul vlastní metodu chovu GF kuřat. Balzam (1937) studoval již na GF kuřatech vliv střevní mikroflóry na potřebu B-vitamínu. Akazawa (1942) použil GF kuřata ke studiu vlivu některých mikrobů na kuřata.

Reyniers aj. získali v r. 1943 GF kuřata, rozpracovali techniku jejich chovu a výživy a dosáhli snášku a reprodukci (1949 a, b). Reyniers vypracoval standardní postup pro získání GF kuřat, z něhož jsme při své práci vycházeli. Luckey aj. (1960) pracoval také s GF krůtaty a Reyniers aj. (1960) se začal zabývat chovem GF křepelek.

Otázkami výživy se podrobně zabýval Luckey (1959, 1963). Vypracoval řadu diet. Při výživě GF kuřat praktickou sterilizovanou dietou (sterilizace parou pod tlakem) nedosáhl uspokojivého růstu kuřat a přistoupil k sestavování syntetických diet. Na kompletní syntetické dietě rostla GF kuřata lépe než kuřata konvenční.

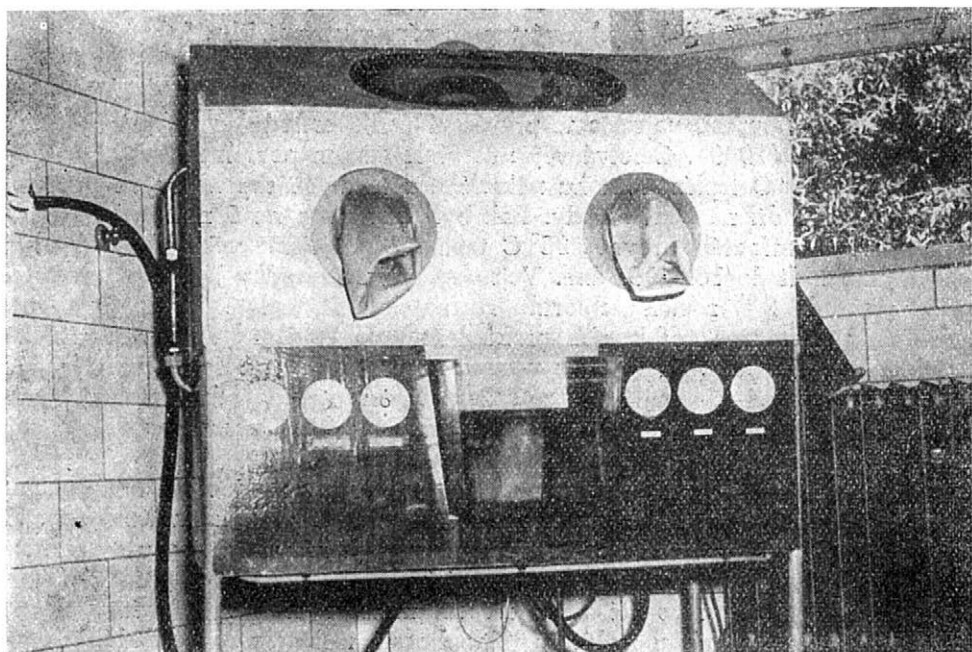
Tento velmi stručný přehled vývoje výzkumu GF kuřat zdaleka nevyčerpává všechno, čeho bylo při řešení chovu bezmikrobních kuřat dosaženo jak co do různých způsobů konstrukce izolátorů (Reyniers 1955, Trexler 1959, Miller aj. 1962, Phillips aj. 1962), tak v problematice jejich výživy a mnohostranného využití pro výzkumnou práci. Podrobnou dokumentaci se, jak jsme již uvedli, zabývá Luckey (1963), která spolu se soubornou publikací New York Academy of Science (1959) byla podkladem pro naše první pokusy o získání bezmikrobních kuřat a jejich odchov.

METODIKA A POKUSNÝ MATERIÁL

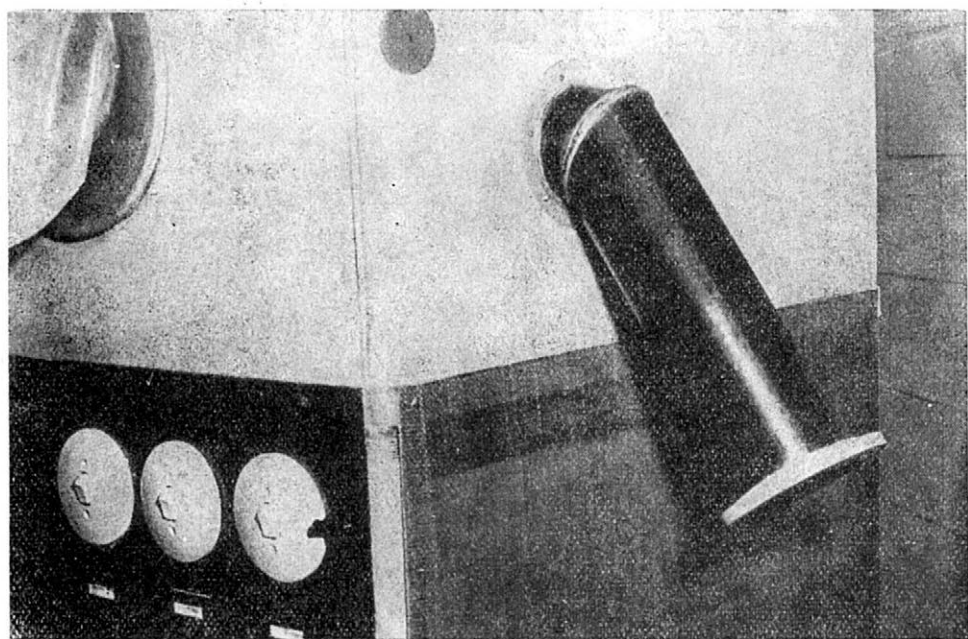
Bylo potřeba vyvinout zařízení pro sterilní líhnutí a odchov kuřat. Vycházeli jsme přitom jednak z literárních informací a jednak z vlastních zkušeností s odchovem bezmikrobních selat a krysích mláďat na našem pracovišti.

Setkali jsme se však s určitými obtížemi při konstrukci sterilní líhne, kdy jsme nemohli v našich pracovních podmínkách a při našich materiálových možnostech vycházet zcela ze zahraničních zkušeností. Bylo třeba provést líheň jako samostatnou jednotku, z níž by byla kuřata přenášena za sterilních podmínek do odchovných izolátorů. Tato líheň měla mít funkci dolíhne, aby bylo možno v krátkých intervalech zásobovat odchovné izolátory dalšími kuřaty. Kromě toho se pro obsluhu líhne ukázal vhodnější kapalinový uzávěr naplněný 3–4 % roztokem chlorseptolu místo 2 % roztoku chloridu rtuťnatého, který způsobuje silnou korozi kovů a sám o sobě je silným jedem. Famosept rovněž poškozoval hliníkové součásti prokládaných předmětů. S používáním chlorseptolu vznikly však další komplikace, které bylo nutno vyřešit.

Po řadě zkoušek, při nichž jsme nahrazovali nevyhovující způsoby termoregulace a ventilace způsoby vhodnějšími, byla dána do provozu sterilní líheň tak, jak je zobrazena na obr. 1. Je zhotovena z pozinkovaného plechu krytého izolační vrstvou asi 1 cm vysokého polystyrénu. V přední stěně jsou vsazeny gumové rukavice, v podlaze je otvor prokládací (kapalinový uzávěr) s roztokem chlorseptolu a v boční stěně pomocný trubkový prokládací otvor pro přesun vajec do líhne z nádoby naplněné 2 % roztokem chloridu rtuťnatého (obráz. 2). Líheň je vybavena malou dolíhňovou liskou, na kterou je možno uložit 15 až 20 vajec. Vlhkost je řízena doplňováním vody do prostoru snížené podlahy líhne. Větrání je zajištěno vháněním přehřátého stlačeného vzduchu přes bakterio-



1. Sterilní dolíheň.

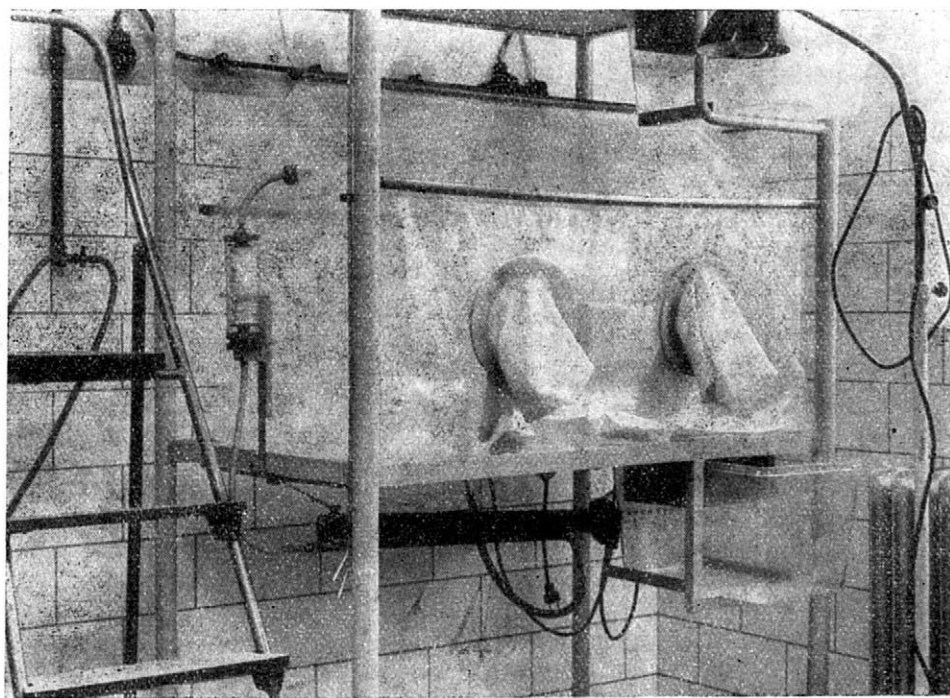


2. Pomocný trubkový prokladač sterilní dolíhně.

logický filtr (vstupní filtr) a jeho výstupem přes výstupní filtr. Líheň má vlastní vyhřívání pod podlahou. Tepelná regulace je zajišťována teploměrem typu Vertex, zapuštěným až k vejším.

Sterilizaci povrchu vajec jsme prováděli podle metody vypracované Reyniersem aj. (1949). Čerstvá vejce se zcela čistým povrchem byla kartáčkem vydrhnuta v 38° C teplém roztoku některého z tekutých saponátových přípravků v poměru asi 1 díl na 3 díly vody. Pak byla ponořena na 5 minut do 2% roztoku chloridu rtuťnatého, rovněž 38° C teplého. Nato jsme vejce vložili do líhně a nesterilně líhli do 18.—19. dne. Vejce se živými zárodky byla opět ponořena na 5 minut do 2% roztoku chloridu rtuťnatého při teplotě 38° C (v silonové punčče) a protažena trubkovým prokladačem do sterilní dolíhně. Dezinfekční roztok, zachycený na vejcích, jsme nechali zaschnout. Vejce se do dezinfekčního roztoku neponořují hlouběji, než přibližně 1 cm pod povrch roztoku. Vylíhlá a oschlá kuřata byla po odběru mikrobiologických vzorků přenesena ve sterilních nádobách s těsnícím uzávěrem do odchovného izolátoru.

Jako odchovné izolátory jsme využili izolátory z měkkých plastických hmot, užívané na našem pracovišti pro pokusy s odchovem GF krysích mláďat (obr. 3). Tyto izolátory jsou větrány opět stlačeným vzduchem vháněným přes bakteriologické filtry vstupní dovnitř a vystupujícím přes filtry výstupní. Teplota je řízena termoregulátorem s éterovým diskem umístěným k výhřevnému elektrickému tělesu pod podlahou izolátoru. Kapalinový uzávěr pro prokládání krmiva a potřebných předmětů dovnitř a ven je naplněn opět 3—4% roztokem chlorseptolu. Přední stěna izolátoru je vybavena gumovými rukavicemi. Kuřata se pohybovala volně na sterilních hoblovačkách, nebo byla umístěna do klecí z no-

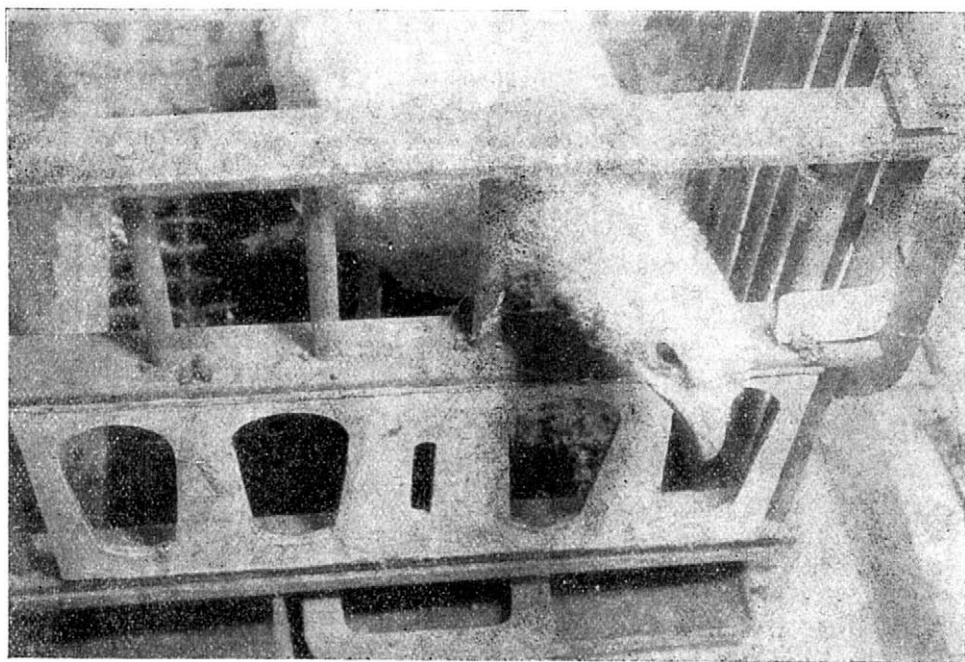


3. Odchovný izolátor.

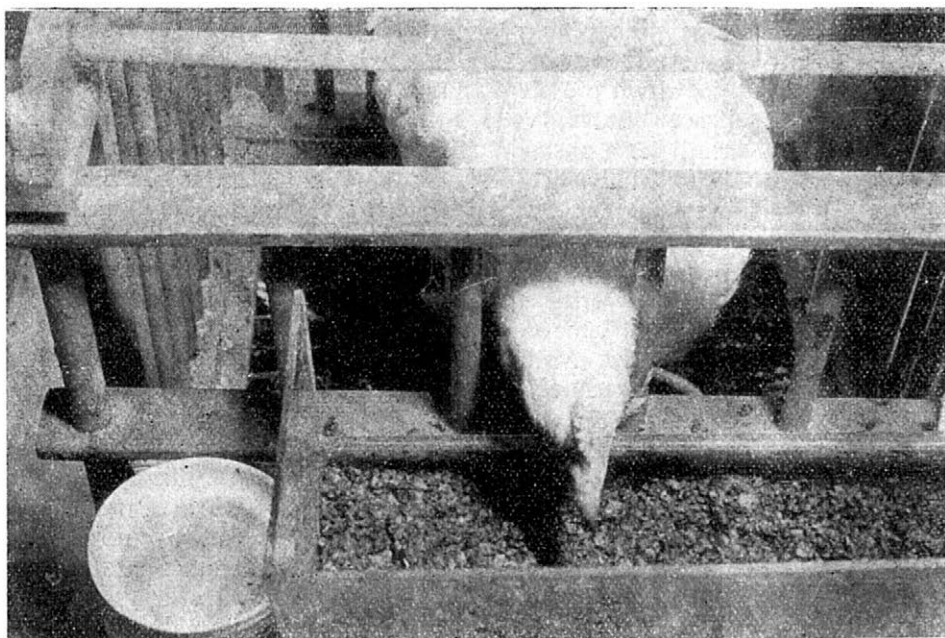
voduru na podlázky ze silonového výpletu, pod kterým byl zasunovací trusník (obr. 4). Krmítka z novoduru nebo plexiskla byla na samostatných podstavcích a mohli jsme je tedy používat pro obojí způsob odchovu (obr. 5).

Způsoby sterilizace krmiva, vody a různých předmětů, potřebných pro líhnutí a odchov: krmili jsme obchodní bílkovinnou směsí pro kuřata zvlhčenou vodou v poměru 2 díly krmiva a 3 díly vody. Takto připravenou směsí jsme plnili transfúzní láhve o obsahu 300 ml a sterilizovali v autoklávu pod tlakem 1,5 atm po dobu 30 minut třikrát po 24hodinových intervalech. Vodu jsme sterilizovali rovněž v transfúzních láhvích pod tlakem nejméně 1 atm po dobu alespoň 30 minut. Protože sterilizací za horka pod tlakem dochází k silné destrukci vitamínů, doplňovali jsme vitamíny A, D, E a vitamíny skupiny B přidáním do vody nebo krmiva uvnitř izolátoru. Různé předměty, jako nástroje, nádoby, utěrky, tampony, zkumavky apod. jsme sterilizovali buď obdobně parou pod tlakem, nebo jsme kombinovali sterilizaci v autoklávu se sterilizací v horkovzdušném sterilizátoru (hoblovačky, talek k ošetření rukavic). Jako obaly pro tyto potřeby nám sloužily opět transfúzní láhve o různé velikosti a nádoby s těsnícím uzávěrem. Sterilizaci povrchu prokládaných nádob a některých předmětů jsme podle povahy materiálu a potřeby prováděli buď v autoklávu pod tlakem (zabalené v papíře), nebo namočením na určitou dobu do roztoku chlorseptolu v kapalinovém uzávěru izolátoru.

Izolátory a liheň jsme sterilizovali rozstřikováním 4% formalínu do prostoru a po stěnách. Asi po 48 hodinách byly vzniklé formalínové páry odvětrány vhněním stlačeného vzduchu přes filtr a případné zbytky formalínu byly neutralizovány rozstřikováním čpavku. Protože tento způsob sterilizace byl zdoluhavý (odvětrávání trvalo další dva dny) a gumové rukavice byly značně působením formalínu poškozovány, přistoupili jsme k dezinfekci izolátorů rozstřiko-



4. Germfree leghorna bílá, stáří 45 dní, klec umístěna v izolátoru



5. Germfree leghorna bílá, stáří 45 dní. Krmítko s napáječkou.

váním 3—4% roztoku chlorseptolu, který jsme nechali působit alespoň 24 hodin a potom jsme izolátory vysušili odstraněním zbytků chlorseptolu přímo do

kapalinového prokladače. Výhodou chlorseptolu je také jeho neškodnost pro zvířata. Bakteriologické filtry pro vstup a výstup vzduchu byly čas od času postříkovány dezinfekčním roztokem, nebo, šlo-li o filtry v kovových obalech, byly vysterylizovány v autoklávu.



6. Kohoutek z křížení RI X LB, odchovaný ve stavu germfree do stáří 28 dní

V průběhu líhnutí a odchovu jsme prováděli mikrobiologickou kontrolu vajec, zvířat, krmiva a výkalů. Stěry se stěn izolátorů, připravených k pokusu, byly očkovány do masopeptonového bujónu a do bujónu s thioglykolátem a inkubovány při 37° C 10 dní. V některých případech byl použit bujón s glukózou a bylo inkubováno při 26° C. Zbytky vylíhlých vajec, vzorky z nevylíhlých vajec (například vnitřní orgány uhynulých embryí, tekutiny), výtěry z rekta kuřat, vzorky potravy a podestýlky, orgány ubynulých nebo zabíjených zvířat byly očkovány rovněž do masopeptonového bujónu a dále do bujónu s glukózou nebo maltózou. Bu-

jóny byly pak vycčkovány třikrát v třídených intervalech na krevní agar za aerobních i anaerobních podmínek. Průběžně byly sledovány preparáty připravené podle Gramma. Pckud byla na preparátech zjištěna mikroflóra a nálezy na různých kultivačních půdách byly negativní, mohlo jít o uhynulé zbytky mikroflóry po dezinfekci a sterilizaci nebo mohlo dojít při odběru vzorků ke styku těchto vzorků s dezinfekčním roztokem. Mohlo také jít o mikroorganismy, které na našich běžných půdách nerostou. Byla proto provedena v těchto případech další šetření na speciálních půdách, na příklad s minerálními zdroji uhlíku a dusíku. Virologická kontrola prováděna nebyla.

Násadová vejce jsme získávali z rozmnožovacích chovů slepic plemene vlaška koroptví, leghorna bílá, rodajlendka a z křížení leghorna bílá s rodajlendkou. Pokusy probíhaly od října 1964 do května 1965.

VÝSLEDKY A DISKUSE

První řadou pokusů jsme zkoušeli především vhodnost konstrukce a vybavení předlíhne, sterilní dolíhne a izolátorů. V prvním pokuse se vylíhla ze 7 vajec vložených do sterilní dolíhne 3 kuřata, z nichž jsme 2 zcela zdravá přenesli do sterilního izolátoru k dalšímu odchovu. Umístili jsme je do klecí a odchovávali do stáří 45 dní (obr. 4 a 5). Do tohoto stáří byla kuřata na základě popsaných mikrobiologických testů germfree. S úmyslem odchovat obě slepičky až do pohlavní dospělosti, přemístili jsme je do dalšího izolátoru volně na podestýlku z hoblovaček. Poškozením izolátoru byly obě slepičky zkontaminovány aerobní a anaerobní mikroflórou. *Bacterium coli* zjištěno nebylo. Kuřice jsme ponechali v izolátoru, abychom si ověřili technické podmínky obsluhy takto chovaných zvířat a vliv nezvyklého životního prostředí a výživy sterilizovanou dietou na jejich další vývoj a zdravotní stav. Ve stáří 123 dní jsme kuřice přemístili do konvenčních podmínek a chovali dále na sterilizované dietě. Živá váha byla 1300 a 1400 g (plemeno leghorna bílá). Ve stáří 147 dní snesla jedna ze slepic první vejce.

Protože z 15 nasazených vajec jsme do dolíhne mohli vložit jenom 7 se živými zárodky a z těchto se vylíhla jenom 3 kuřata, přičetli jsme výsledek líhnutí především na účet nízké biologické hodnoty násadových vajec. Dále jsme zjistili, že starší kuřata bude výhodnější odchovávat bez podestýlky na rcstech, ať již v klecích nebo volně ve zvlášť upraveném izolátoru.

V dalších několika pokusech docházelo k defektům na výhřevném, regulačním a ventilačním zařízení líhny. Při postupném odstraňování konstrukčních nedostatků vzniklo však již podezření, že nebude vhodné prokládat vejce ošetřená chloridem rtuťnatým přes kapalinový uzávěr, naplněný chlorseptolem. Tuto skutečnost jsme si potvrdili, když jsme sublimátem dezinfikovaná vejce jen krátce namočili do roztoku chlorseptolu (z 8 vajec vložených do dolíhne se vylíhlo 8 kuřat) a když jsme nato proložili vejce přes roztok chlorseptolu v kapalinovém uzávěru, což trvalo podstatně delší dobu, a ze 14 vajec vložených do dolíhne se nevylíhlo ani jedno kuře. V dalším pokuse jsme sublimátem ošetřená vejce nechali dolíhnout nesterilně, bez styku s chlorseptolem, a z 10 vajec jsme získali 8 kuřat.

Po těchto zkušenostech jsme upravili sterilní dolíheň tak, že jsme do boční stěny vsadili pomocný trubkový prokladač, kterým jsme v dalších 2 pokusech protahovali vejce do dolíhne přímo z roztoku chloridu rtuťnatého, trubku jsme

potom sterilně uzavřeli gumovým náplekem a nádobu se sublimátem jsme mohli odstranit.

Za těchto podmínek jsme z 10 vajec (RI × LB) sterilně získali 7 kuřat, z nichž jsme 5 přemístili do odchovného izolátoru a s úspěchem odchovali do stanoveného konce pokusu (stáří kuřat 28 dní) ve stavu germfree (obr. 6). Živá váha těchto kuřat, jednoho kohoutka a 3 slepiček, byla ve stáří 28 dní v průměru 209 g (195–223 g). V dalším pokuse jsme z 10 vajec vlašek korpových získali sterilně 8 kuřat, z nichž jsme 7 odchovali ve sterilních podmínkách do konce pokusu (stáří kuřat 21 dní) opět prosté mikrobů. Tato kuřata, 3 kohoutci a 4 slepičky, dosáhla ve stáří 21 dní průměrné živé váhy 133 g (98–163 g). Všechna odchovávaná kuřata dobře opeřovala a nebyly na nich patrné známky deficiencie živin. Protože šlo o pokusy krátkodobé, byla kuřata chována v izolátorech volně na podestýlce z hoblovaček, které nemusely být během pokusu vyměněny.

Popsaný způsob získání a odchovu bezmikrobních kuřat spolu se způsobem mikrobiologické kontroly lze považovat za jeden z vhodných postupů produkce GF kuřat pro další experimentální využití v oblasti biologie, fyziologie, imunologie aj. a pro rozvinutí řady různého stupně kontaminace těchto zvířat (monokontaminace, dikontaminace, stav pathogenfree aj.) podle experimentálních potřeb.

SOUHRN

V článku jsou popsány první vlastní pokusy o odchov bezmikrobních (germ-free) kuřat. Byla vylíhnutá a s úspěchem odchována kuřata ve sterilních podmínkách. Jejich výživa byla zajišťována sterilní praktickou dietou. Stav germ-free byl zachován po stanovenou dobu pokusů (21, 28 a 45 dní). U dvou slepic, chovaných jako exgermfree dále ve sterilních podmínkách bylo dosaženo pohlavní dospělosti. Popsaný způsob získání, odchovu a mikrobiologické kontroly kuřat je možno využít jako jeden z vhodných postupů při produkci GF kuřat pro další experimentální využití.

Došlo dne 15. 9. 1965

Literatura

1. AKAZAWA K.: Growth of germfree reared chicks and intestinal bacterial flora. = J. Chiba Med. Soc. 20, 1884-1920, 1942 (z Luckey T. D., 1963). — 2. BALZAM N.: Élevage aseptique des animaux. I. Appareillage et méthodes. II. Élevage aseptique des poules maintenues aux régimes complets et déficients. = Ann. physiol. 13, 370-385, 1937 (z Luckey T. D.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 1959). — 3. COHENDY M.: Expériences sur la vie sans microbes. = Ann. inst. Pasteur 26, 106-137, 1912 (z Luckey T. D., 1963). — 4. KOLEKTIV AUTORŮ: Germfree vertebrates: present status. = Annals of the New York Academy of Sciences 78, 1-400, 1959. — 5. LUCKEY T. D.: Nutrition and biochemistry of germfree chicks. = Annals N. Y. Acad. Sci. 78, 127-165, 1959. — 6. LUCKEY T. D., WAGNER M., GORDON H. A., REYNIERS J. A.: Rearing germfree turkeys. = Lobund Rept. 3, 176-182, 1960 (z Luckey T. D., 1963). — 7. LUCKEY T. D.: Germfree life and gnotobiology. = Academic Press, New York and London, 1963. — 8. MILLER H. T., LUCKEY T. D.: A new germfree chicken cage - characteristics and use. = Applied Microbiology 10, 1:52-54, 1962. — 9. NAITO R.,

KOBAYASHI M.: On the germfree rearing chicks. = J. Japan. Microbiol. 30, 1867-1868, 1936 (z Luckey T. D., 1963). — 10. NUTTAL G. H. F., THIERFELDER H.: Thierisches Leben ohne Bakterien im Verdauungskanal. (III. Mitteilung). Versuche am Hühnern. = Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler's 23, 231-235, 1897 (z Luckey T. D., 1963). — 11. PHILLIPS A. W., NEWCOMB H. R., LACHAPPELLE R., BALISH E.: Rearing of germfree and monocontaminated chicks in rigid plastic isolators. = Applied Microbiology 10, 3, 224-230, 1962. — 12. REYNIERS J. A., TREXLER P. C., ERVIN R. F., WAGNER M., LUCKEY T. D., GORDON H. A.: A complete life-cycle in the „germ-free“ Bantam Chicken. = Nature 163, 67-68, 1949a (z Luckey T. D., 1963). — 13. REYNIERS J. A., TREXLER P. C., ERVIN R. F., WAGNER M., LUCKEY T. D., GORDON H. A.: Rearing germ-free chickens. = Lobund Rept. 2, 1-116, 1949b (z Luckey T. D., 1963). — 14. REYNIERS J. A.: Germfree life methodology (gnoto-biotics) and experimental nutrition. Conférences et rapports présentées au 3-ème Congrès international de biochimie. Bruxelles 1-6 aout, 458-466, 1955. Liège, H. Vaillant-Carmanne, S. A., 1956. — 15. REYNIERS J. A., SACKSTEDER M. R.: Raising Japanese quail under germfree and conventional conditions and their use in cancer research. = Journal of the National Cancer Institute 24, 6:1405-1421, 1960. — 16. SCHOTTELIUS M.: Die Bedeutung der Darmbakterien für die Ernährung. I. = Arch. Hyg. 34, 210-243, 1899 (z Luckey T. D., 1963). — 17. TREXLER P. C.: The use of plastic in the design of isolator systems. = Ann. N. Y. Acad. Sci. 78, 29-36, 1959.

Результаты опытов и выращивание безмикробных (germfree) цыплят

Описываются первые местные опыты выращивания безмикробных (germfree) цыплят. Цыплята были выведены и выращены в стерильных условиях. Их питание обеспечивалось стерильной практической диетой. Состояние безмикробности сохранялось в течение всего срока опытов (21, 28 и 45 дней). Две курицы, выращиваемые и в дальнейшем как exgermfree в стерильных условиях, достигли половой зрелости. Описанный способ выведения, выращивания и микробиологического контроля цыплят можно использовать в качестве одного из эффективных приемов при продукции GF цыплят в целях их дальнейшего экспериментального использования.

The Results of Attempts at rearing Germfree Chickens

The first own attempts of the authors at rearing germfree chickens are described. The chickens were hatched and successfully reared under sterile conditions. Their feeding was ensured by means of sterile practical diet. The germfree state was maintained for the settled time of experiments (21, 28, and 45 days). Two hens kept further as exgermfree under sterile conditions reached sexual maturity. The described way of obtaining, rearing, and microbiological control of the chickens may be used as one of the suitable processes in producing germfree chickens for further experimental utilization.

Forschungsergebnisse und Aufzucht von keimlosen (germfree) Küken

Die ersten eigenen Versuche über die Aufzucht von keimlosen (germfree) Küken werden beschrieben. Küken bei sterilen Bedingungen wurden erbrütet und die Aufzucht mit Erfolg durchgeführt. Die Ernährung wurde durch sterile praktische Diät gesichert. Der germfree-Zustand wurde während der festgelegten Versuchszeit (21, 28, und 45 Tage) eingehalten. Zwei Hennen, die weiter als exgermfree bei ste-

rielen Bedingungen gehalten worden waren, erreichten die Geschlechtsreife. Die beschriebene Art der Gewinnung, Aufzucht und der mikrobiologischen Kontrolle der Kücken kann als einer der geeigneten Vorgänge bei der Produktion von GF-Kücken für weitere experimentelle Arbeiten ausgenutzt werden.

Adresy autorů:

Inž. Alexandra Šimková, CSc., inž. Lubor Šimek, CSc., Alois Lanc, Mikrobiologický ústav ČSAV, Praha-Krč, Budejovická 1083

■ Při fyziologických pokusech, kdy bylo nutno kontrolovat přesná zavádění elektrod do některých orgánů pokusných zvířat jsme zjistili, že změny polarizačního charakteru, které vyvolal průtok stejnosměrného proudu tkáněmi, orgány, nebo některými tělesnými tekutinami jsou pro ně typické, zejména tehdy, jestliže je srovnáváme se změnami, které v těchto materiálech vyvolal průtok elektrického proudu stejného napětí, ale opačného směru.

LITERARNÍ PŘEHLED

Ve světovém písemnictví jsme nenalezli zmínky o tom, že by se někdo zabýval zjišťováním polarizačních změn ve tkáni, nebo jiných materiálech po průtoku stejnosměrného elektrického proudu a hodnotil tyto změny srovnáváním se změnami vzniklými proudem opačného směru. Pokusy o měření elektrického odporu tkání pochází z dřívější doby. Schäfer (1940) uvádí několik starších autorů, kteří se snažili uvést v nějaký soulad vztah získaných dat elektrického odporu při průchodu proudu různými tkáněmi. Obširný přehled elektrofyziologických metod v biologickém výzkumu a jejich aplikaci přenášejí v souborné anglicky psané publikaci Bureš, Petrů a Zachar v r. 1962. O polarizaci v biologických materiálech, stanovení impedancí a o vlivech studovaných materiálů na polarizaci elektrod souborně pojednává Schwan (1963). Otázkami vzniku, velikosti a stanovení svorkového napětí při studiu biologického materiálu, vztahem a závislosti propustnosti některých jontů biologickými membránami se zabývali Moore a Cole (1963). Měřením elektrického polarizačního a ztrátového odporu ve tkáních se zabývala nověji řada autorů. Tak např. Vávra a Mělka (1943) sledovali změny ohmického odporu jaterní tkáně v závislosti na čase a Vávra a Mělka (1944) se zabývali výkladem průběhu křivek elektrického odporu tkání po vytěžení z těla. Zjistili, že na této výslednici se zúčastní dva činitele, a to pokles membránové polarizace a úbytek tekutin z mezibuněčných prostorů. Kryšpín a Klen (1955) použili metody měření ohmického odporu tkání k zjišťování přežitelnosti orgánových štěpů. Pro klinickou diagnostiku použili měření elektrického odporu tkáně Masný a Habanec (1942). K zjištění rozsahu a sídla zánětlivého ložiska se snažil využít změn kožního odporu a intenzity použitého proudu Lesný (1962). Určováním volumového procenta krvinek v krvi metodou elektrické vodivosti se zabýval Drastich (1943) a před ním v roce 1919 Stewart. Také Vávra a Mělka (1943) se tímto problémem zabývali. Ipsér se svými spolupracovníky (1961) sledovali v tkáních lidí vlastnosti elektrochemického potenciálu vyvolaného průtokem galvanického proudu, určovali jeho charakter, sledovali jeho odeznívání a získané vztahy graficky zaznamenávali. Zjistili, že polarizační potenciál během galvanizace stoupá, nejprve rychle, pak pomaleji a po dosažení maxima, prochází-li dále proud, na tomto maximu setrvává, nebo jen o něco málo poklesne. Podle jejich zjištění po přerušení proudu nastává depolarizace tkání, která má, graficky vyjádřeno, charakteristický, přesně hyperbolický průběh. Zjistili dále, že tato depolarizace je zevně mechanicky ovlivnitelná a pokusili se o praktické zhodnocení. Ipsér a Konečný (1961) studiem polarizačních změn v lidské kůži došli k závěru, že při průchodu stejnosměrného elek-

trického proudu kůží vzniklý elektrochemický potenciál v různých vrstvách lidské kůže a podkožního vaziva je různý a že je výsledkem polarizovatelnosti těchto vrstev. Kryšpín, Harantová, Šafránková (1963) poukazují na zjištěnou reversibilitu polarizačních změn tkání a změny elektrického odporu kůže uvádějí ve vztah se stavem kůže. Vysvětlují je jako projev buněčných a tkáňových regulací kožní bariéry. Závislost změn elektrického odporu jaterní tkáně na funkčních stavech jater zaznamenal v roce 1939 Hasama. Také Mourek (1961) zjistil u krysa, že funkční stav kory mozku je v úzkém vztahu s velikostí elektrického odporu, který tato tkáň klade průtoku elektrického proudu. Žádný z těchto autorů, ani autoři jimi uvádění však nepoužili k hodnocení tkání nebo biologických či jiných materiálů změn, které vyvolá průtok stejnosměrného elektrického proudu těmito materiály, vedený nejprve jedním, pak druhým směrem.

METODIKA

ZDROJ PROUDU

Jako zdroje proudu jsme pro naše pokusy použili akumulátorových nikl-kadmiových článků o kapacitě 22 Ah. Při naší spotřebě proudu byl tento zdroj dostatečně tvrdý, takže napětí se prakticky neměnilo. Abychom ovlivnili rychlost změn, ke kterým v tkání dochází a mohli tak volit nejvhodnější parametry, použili jsme různých napětí daných různým počtem použitých článků; 6, 12, 24 a 32 V. Proud jsme pak ještě odebírali přes dělič napětí, kterým jsme doregulovali napětí tak, abychom co nejlépe využili celého použitého rozsahu miliampermetru. Proud protékal zkoumanou tkání až do doby, kdy se jeho intenzita přestávala zřetelněji měnit. V závislosti na napětí jsme volili časové úseky 30, 60, 180 a 360 vteřin. Po těchto časových intervalech byl směr proudu obrácen. Ve chvíli, kdy se intenzita proudu přestávala zřetelněji měnit, byl pokus znova opakován (celkem třikrát).

POUŽITÉ ELEKTRODY

Abychom vyloučili vliv změn na povrchových vrstvách elektrod, volili jsme zprvu elektrody železné, měděné, hliníkové, platinové a zároveň elektrody různých tvarů: válcové (průměr 1 mm) a plošné (plocha 4 cm²). Protože získané výsledky se příliš nelišily, vyloučili jsme později všechny ostatní elektrody a používali jsme pouze platinové, u kterých jsme předpokládali vliv nejmenší. Vzdálenost elektrod jsme také použili různou: 1, 3, 6 a 12 cm. Poněvadž při předběžných pokusech se ukázalo, že vzdálenost, pokud k ní bylo použito úměrného napětí, nerozhoduje, volili jsme nadále vzdálenost takovou, která byla nejvhodnější pro použitý materiál, raději větší, a to proto, aby nedošlo ke krátkému spojení a materiál se méně prohříval. Zpočátku jsme elektrody vyměňovali, posunovali i přemisťovali. Předběžně možno říci, že výsledek tím nebyl ovlivněn.

REGISTRACE INTENZITY PROTÉKAJÍCÍHO PROUDU

Jako registrační měřicí přístroj jsme použili přístroj značky Wareg Metra Blansko. Výhodou tohoto přístroje pro naše účely byla snadná měnitelnost rychlosti posunu registračního papíru. To nám totiž umožnilo zdůraznit strmost křivek, aniž bychom zvyšovali napětí, či přibližovali elektrody. Byli jsme si vědomi značné spotřeby proudu tohoto měřicího systému, pro nás však měly větší cenu hodnoty relativní než absolutní.

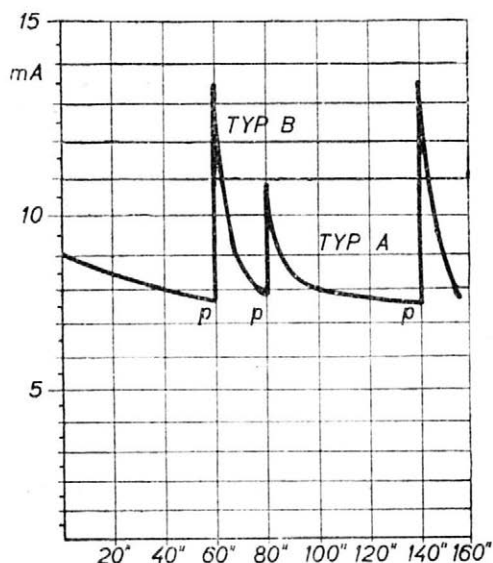
Při našich měřeních bylo tedy možno měnit napětí, dobu průtoku, vzdálenost elektrod, podle toho pak měnit rozsah měřicího přístroje i rychlost záznamu. Postup při vlastním měření byl zhruba tento:

Po předběžném překontrolování celého měřicího systému jsme na jiné části vzorku změřili zhruba odpor, který klade při takovém vložení elektrod, jaké jsme hodlali použít. Podle toho jsme se rozhodli k větší nebo menší vzdálenosti, k většímu nebo menšímu napětí. Dále jsme na téže části vzorku zjistili krajní hodnoty intenzity protékajícího proudu. Podle toho jsme volili měřicí rozsah registračního přístroje, eventuálně opravili použité napětí. Pomocí přepínače jsme pak změnil směr proudu a zjistili, jestli druhá křivka nepřesahuje zvolený rozsah. Záznam, který

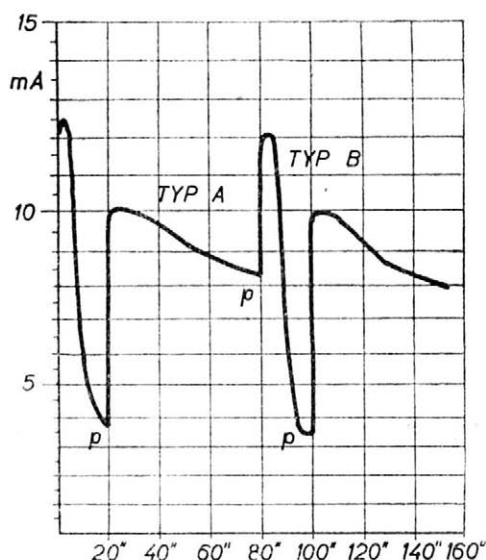
se při těchto měřeních získal, sloužil také k tomu, aby se volila nejvhodnější doba pro ten který materiál průtoku proudu v prvním a druhém směru. Pro vlastní měření jsme použili jinou část vzorku, poněvadž jsme zjistili, že vliv těchto zkoušek, i když není velký, přece jen výsledné křivky mění. Tento předběžný pokus byl nutný tam, kde se začínalo s měřením zcela neznámého a podstatně odlišného materiálu.

VÝSLEDKY

Vložíme-li na měrné elektrody napětí, změny vznikající ve zkoumaném materiálu ovlivňují procházející proud, takže při grafickém znázornění tohoto proudu dostáváme křivku, charakterisovanou při zapnutí náhlým vzestupem proudu, který vystřídá pomalý nebo rychlejší pokles. Tento se vždy zpomaluje, až se ustálí, posuzováno z hlediska doby měření, na určité hodnotě. Křivku tohoto typu dostáváme pokaždé a bez ohledu na to kterým směrem jsme proud nechali při počátečním zapnutí protékat. Typ A. (obr. 1, 2). Přivedeme-li nyní na elektrody napětí opačné polarity z téhož zdroje a zaznamenáváme-li hodnoty procházejícího proudu, dostá-



Obr. 1 Model křivky typu 1A a 1B
p — okamžik přepólování



Obr. 2 Model křivky typu IIA a IIB
p — okamžik přepólování

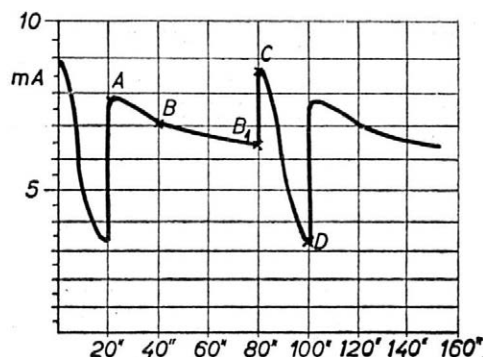
váme křivku druhou — typ B —, která může spolu s křivkou prvou určovat charakter zkoumaného materiálu. Vyjadřuje průběh depolarizačních změn stavu, který v tomto materiálu vyvolal průtok elektrického proudu směrem prvním.

Jeví se nám obvykle jako křivka dvojího typu: (obr. 1 a 2).

1. Křivka velmi podobná křivce prvé, lišící se, srovnáváme-li ji s křivkou prvou, prudším poklesem intenzity elektrického proudu (obr. 1 typ IB).
2. Křivka zcela rozdílná (většina případů měření) (obr. 2, typ IIB), vyznačená nejprve prudkým stoupnutím, vystřídáným rychlým, skoro lineárním poklesem, který po 10 až 20 vteřinách, někdy později, se nelineárně začne zmenšovat až se přibližně vrátí k hodnotám, na kterých se ustálil pokles v případě křivky prvé.

Přerušíme-li při největším poklesu průtoku elektrického proudu pochod změn, vyvolaných tímto průtokem, dostaneme při dalším předpólování elektrod křivku typu A, a to stejných hodnot jako při počátku měření, resp. jako u materiálu, kterým ještě elektrický proud neprocházel.

Nepřerušíme-li tento zpětný vzestup elektrického proudu a necháme-li ho dojít



Obr. 3. Model výsledné dvojice křivek:
bod A udává celkový odpor,
bod B předpokládané ukončení
změn.
Bod B1 je bodem ustálení odporu
a okamžikem přepólování
Bod C představuje nejnížší hodnotu
odporu po přepólování
Bod D je hodnotou největšího odporu.

přibližně až k hodnotám ustálení křivky první, dostaneme při dalším přepólování křivku typu IB.

Naproti tomu, necháme-li protékat stejnosměrný elektrický proud prvním směrem z hlediska doby měření jakkoliv dlouho, vyvolané změny podrží své vlastnosti a při příštím přepólování elektrod dostáváme křivku charakterizovanou typem IIB. Vznikání těchto změn je však ukončeno dříve asi za stejnou dobu jako v případě křivky typu IIB, to je přibližně v okamžiku, kdy se křivka typu A začne vracet do kolmého směru (obr. 3, bod B).

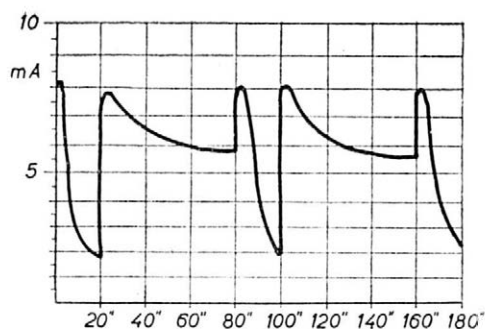
Změny, které jsme vyvolali nuceným průtokem stejnosměrného elektrického proudu při prvním zapojení jsou reversibilní a vrátí se k původním hodnotám, jestliže zařadíme mezi první zapnutí a následující přepólování časovou přestávku asi 1–20 a více minut (podle druhu materiálu), nebo ponecháme-li po přepólování protékat elektrický proud druhým směrem tak dlouho až se intenzita průtoku proudu přiblíží ustálené hodnotě proudu z prvního měření. Rovněž změny vyvolané průtokem elektrického proudu směrem druhým mají reversibilní charakter, ale způsob návratu k původním hodnotám je složitější a do jisté míry může také sloužit k identifikaci zkoumané látky.

DISKUSE

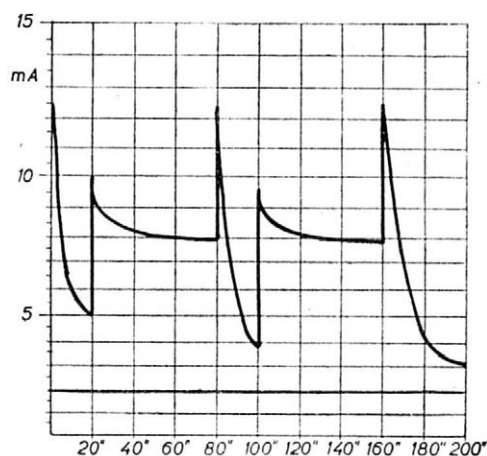
Je zajímavé, že tkáň, která byla původně vodivá pro stejnosměrný elektrický proud stejně v obou směrech, nabývá po průtoku stejnosměrného elektrického proudu a ustálení odporu prvním směrem charakteru, připomínajícího polovodiče. Odpor, který tkáň kladě elektrickému proudu v okamžiku kolem jeho zapnutí rychle klesne a pak pomalu stoupá. Změny, které vznikly ve zkoušeném materiálu způsobí, že při přepólování odpor krátce klesne, zpravidla více než v případě první, a pak prudce, téměř lineárně stoupá. Po určitém čase se vzestup odporu zastaví, jeho hodnota se více či méně přibližuje konečné hodnotě předchozího měření. Vzájemný vztah nebo hodnoty či pouze tvar takto získaných dvojic křivek se vyznačují nápadnou konstantností, opakovatelností a tím, že jsou charakteristické pro měřenou látku a její stav. To pochopitelně vnucuje myšlenku využít takového měření pro diagnostické a analytické účely nejrozličnějších materiálů. Tímto způsobem lze např. rozlišit patologický materiál od materiálu zdravého, některé aminokyseliny, výrobky potravinářského průmyslu nebo průmyslu spotřebního zboží. (Obr. 4a, b, c; obr. 5a, b).

Křivka první — typ A —, ačkoliv sama je svým způsobem charakteristická, přece jen má mnoho podobností s křivkami, které dostáváme po průtoku elektrického proudu různými materiály po prvním zapojení. Daleko výraznější je však křivka druhá (obr. 1 a 2, typ B), a to v první řadě svou podobností nebo rozdílností vzhledem ke křivce první.

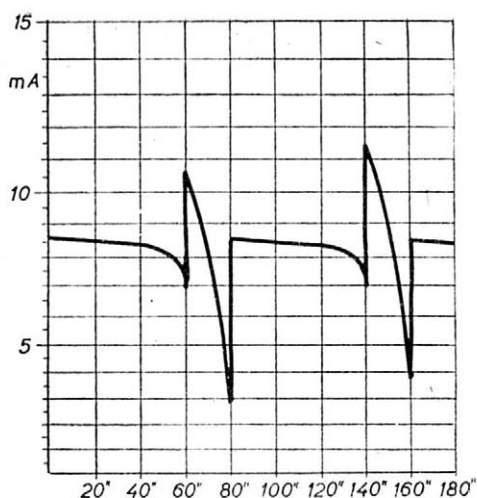
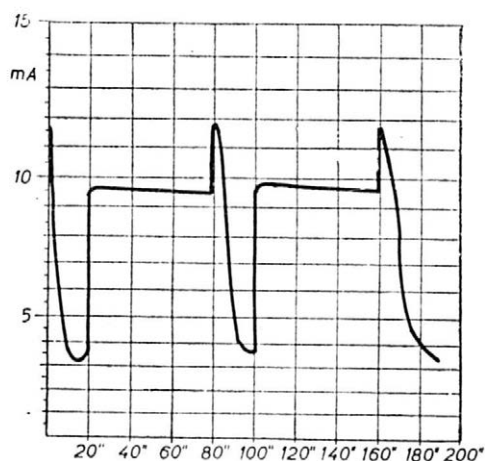
Pochody, ke kterým ve zkoumaném materiálu dochází, během průtoku stejnosměrného elektrického proudu jsou nepochybně značně složité. Zajímavá je jejich reversibilita, a to jak spontánní tak navozená. S touto reversibilitou je nutno při měření počítat a stanovit dobu průtoku elektrického proudu tak, abychom charak-



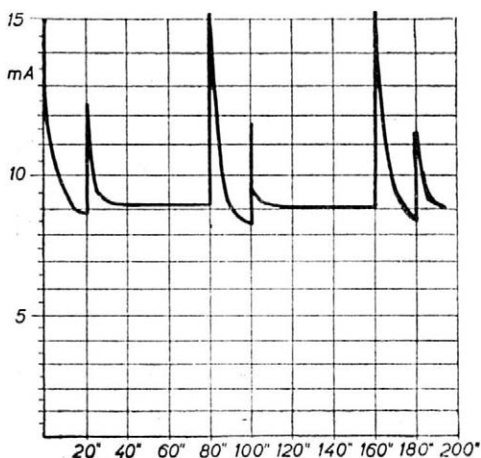
Obr. 4a Nepoškozená část jater pokus. berana.
Výsledná křivka charakterizující zdravou jaterní tkáň berana.



Obr. 4b Tentýž beran — infarktovaná část jater.
Výsledná křivka charakterizující jaterní tkáň téhož berana, změněnou infarktem starým 24 hod.



Obr. 5a Sýr „Moravský bochník“
Výsledná křivka charakterizující sýr zv. „Moravský bochník“



Obr. 5b Sýr „Niva“
Výsledná křivka charakterizující sýr zv. „Niva“

Obr. 4c Tentýž beran — elektrody zasa-
zeny ve zdravé tkáni, mezi nimi
infarktovaná část.
Výsledná křivka jaterní tkáně
berana.
Elektrody byly zasazeny sice ve
zdravé tkáni, ale mezi nimi se
nacházelo infarktem patologicky
změněné ložisko.

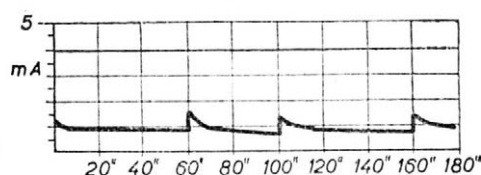
teristické změny, vyvolané ve zkoumaném materiálu průtokem proudu jedním nebo druhým směrem nezrušili nebo nepozměnili. Pro reprodukovatelnost křivek je třeba na počátku měření zkusmo stanovit vhodný časový poměr průtoku proudu jedním i druhým směrem.

Zdá se, že ve většině případů postačí ke vzniku křivky typu A, aby stejnosměrný elektrický proud protékal zkoumanou látkou po dobu jedné minuty, zatím co u křivky druhé, typ B, bude třeba průtok proudu ukončit již asi po 20 vteřinách.

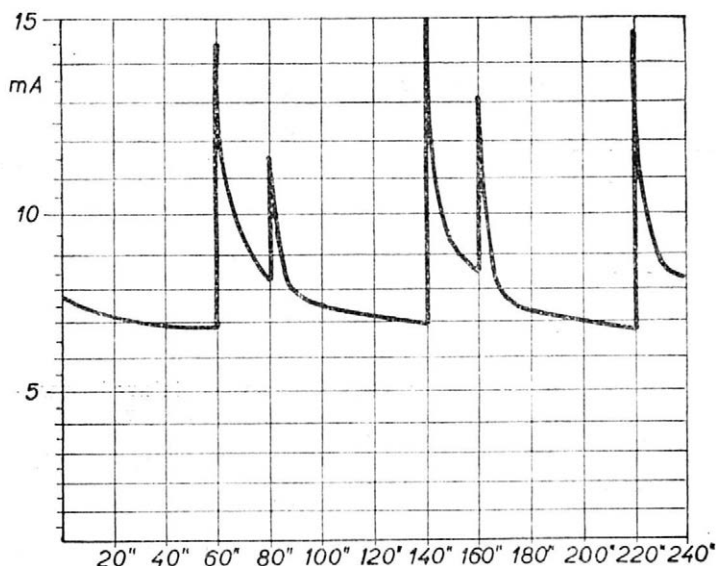
Obr. 3: jsou vyznačeny doby změn probíhající ve zkoumaném materiálu, které se nám jeví jako změna odporu v průtoku elektrického proudu. Bod A udává celkový odpor, který zkoumaná látka klade, B značí předpokládané ukončení změn a ustalování odporu měřeného materiálu, bod B₁ udává okamžik přepólování a bod C značí nejnížší hodnotu odporu po přepólování, bod D pak udává hodnoty největšího odporu. Pro měření je významný rozdíl Y souřadnic bodu C a B₁.

Tvar získaných křivek, resp. jejich hodnoty, jsou charakteristické nejen pro některé chemické látky, tkáně a průmyslové výrobky, ale také pro jejich stav, znečištění a výrobní postupy, takže mohou za určitých předpokladů sloužit k jejich identifikaci a klasifikaci (obr. 4a, b, c, a obr. 5a, b). Jednotlivé metody měření budou ovšem vyžadovat vypracování vlastních postupů. Zda bude vhodnější k stanovení naměřených hodnot matematické vyčíslení či atlasové zpracování nabíhající křivek, je předmětem našeho dalšího studia.

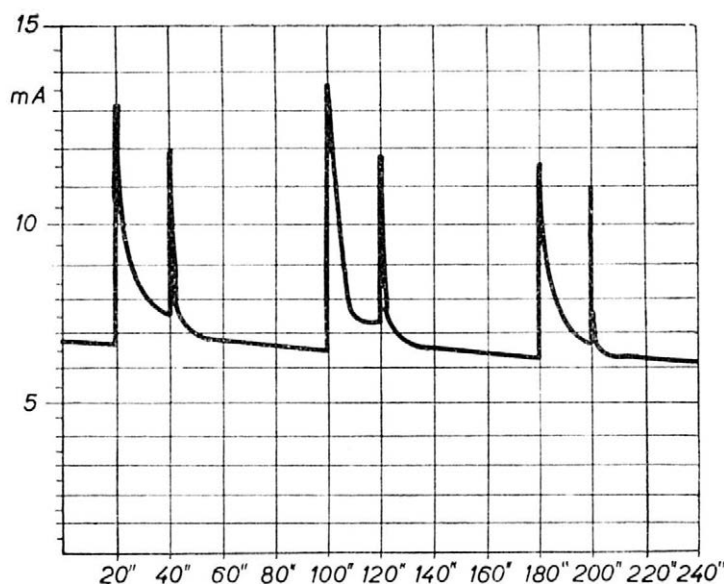
Na rozdíl od řady autorů, kteří se podobnými problémy zabývali a kteří sledovali hlavně intenzitu protékajícího proudu tkáněmi, nás zajímala především otázka, jaké změny z hlediska elektrického vyvolal ve tkáních stejnosměrný elektrický proud a jak se nám, graficky zaznamenáno, tyto změny jeví. Jsme toho názoru, že přístup k problému s této stránky je daleko nejbližší možnosti praktického využití tohoto úkazu. Pro názornost použitelnosti uvádíme v dalším několik původních křivek získaných měřením zkoumané látky a jejího stavu. (Obr. 4a, b, c a 5a, b).



Obr. 6a Žlutý koncepční papír
Výsledná křivka charakterizující žlutý koncepční papír



Obr. 6b Bílý kancelářský papír
Výsledná křivka charakterizující bílý kancelářský papír



Obr. 6c Chromatografický papír
Výsledná křivka
charakterizující
chromatografický papír

SOUHRN

V práci bylo poukázáno na charakteristické změny, které vzniknou v některých látkách a tkáních a průmyslových výrobcích po průtoku stejnosměrného elektrického proudu tímto materiálem, jestliže proud vedeme nejprve jedním a pak druhým směrem. Změny byly graficky zapisovány a v diskusi bylo poukázáno na praktické možnosti jejich využití k účelům identifikace a klasifikace zkoušených materiálů.

Došlo dne 6. 4. 1965

Literatura

- BUREŠ J., PETRÁŇ M., ZACHAR J.: *Electrophysiological Methods in Biological Research*, Praha, ČSAV, 1962. — DRASTICH L.: Určování volumového procenta krvinek metodou elektrické vodivosti. = „Sbor. léc.“, 1943, sv. XLV, s. 91. — IPŠER J., KONEČNÝ M.: Kůže jako překážka hloubkové galvanoterapie. = „Fysiatr. věst.“, 39, 1961, 282. — IPŠER J., KONEČNÝ M., KASOWITZOVÁ M.: Elektromechanický potenciál tkání, vyvolaný průchodem galvanického proudu. = „Fysiatr. věst.“, 39, 1961, 129. — HASAMA B.: Über den Einfluß der Labyrinthreizung auf die Leber im Aktionsstrombilde. = „Ztschr. f. Biologie“, 99, 1939, 169. — KRYŠPIN J., KLEN L.: Elektrofysiologické vlastnosti přežívajících tkání. Referát Transplantace. Hradec Králové, červen 1959. — KRYŠPIN J., HARANTOVÁ Z., ŠAFÁNKOVÁ B.: Elektrické vlastnosti tkání. = „Rozpravy ČSAV“, 10, 1963, roč. 73. — KRYŠPIN J.: Podstata některých změn elektrické vodivosti tkání. = „Babákova sbírka“, 9, 1959, Praha. — LESNÝ I.: „Časopis lékařů českých“, 1942, str. 1089. — MASNÝ V., HANEC J.: „Časopis lékařů českých“, 1942, str. 591. — MOORE J. W., COLE K. S.: *Voltage Clamp Techniques*. = In „Physical Techniques in Biol. Res.“ Akad. press, NY, 1963, Vol. VI, Part B. — MOUREK J.: Changes in impedance of the Cerebral Cortex during Hypoxia. = „Physiol. Bohemosl.“, 10, 1961, 154. — SCHÄFER H.: *Elektrophysiologie* I. B. Deutike, Wien, 1940. — SCHWAN H. P.: Determination of Biological Impedance. In „Physical Techniques in Biological Research“. Acad. press, N. Y., 1963, Vol. 6, Part B. — STEWART C. M. = „Amer. Journ. of Physiol.“, 49,

1919, 233. — VÁVRA R., MĚLKA J.: Měření elektrického polarizačního a ztrátového odporu orgánových kaší. = „Sbor. lék.“, 1943, XLV, 75. — VÁVRA R., MĚLKA J.: Příspěvek k hodnocení poznatků získaných měření elektrické vodivosti tkání. = „Sbor. lék.“, XLVI, 1944, 250.

Оценка и идентификация некоторых тканей и веществ путем изменения течения электрического тока, идущего в двух направлениях

В работе говорится о характеристических изменениях, которые возникают в некоторых веществах и тканях и промышленных продуктах после течения постоянного электрического тока через этот материал, если ток направить сначала в одном, а потом в другом направлении. Изменения были графически зарегистрированы. В дискуссии указывалось на практические возможности их использования для идентификации и классификации испытываемых материалов.

Evaluation and Identification of some Tissues and Substances by means of Changes of Electric Current Passage conducted in both Directions

Characteristic changes were pointed to, arising in certain substances, tissues, and industrial products after the passage of direct electric current through this material, if the current was conducted at first in one, and then in the other direction. The changes were graphically recorded; practical possibilities of their making use for the purpose of diagnostics and classification of examined materials were pointed to in the discussion.

Bewertung und Identifikation einiger Gewebe und Stoffe durch Veränderungen des Durchflusses des nach beiden Richtungen geleiteten Stroms

Es wurde auf die charakteristischen Veränderungen hingewiesen, welche in einigen Stoffen und Geweben sowie industriellen Erzeugnissen nach Durchströmen des elektrischen Gleichstroms durch dieses Material entstehen, falls man den Strom zuerst in der einen Richtung, dann in der anderen leitet. Die Veränderungen wurden graphisch aufgezeichnet und in der Diskussion wurde auf die praktischen Möglichkeiten ihrer Ausnützung zur Identifizierung und Klassifikation der geprüften Materialien hingewiesen.

Adresy autorů:

MVDr. Bohumír H y n e k, RNDr. Milan K e i l, ČSAV — Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů, Uhřetěves

OBSAH

Spurný O., Surynek J.: Hladina ketonových látek mastných kyselin v krvi dojníc v předjarním a jarním období	225
Vlček J., Herzig J.: Působení rybí moučky extrahované xylenem na zdravotní stav a smyslové vlastnosti masa a tuku prasat	233
Itze L., Arendarčík J.: Príspevok k štúdiu antigonadotropného séra pomocou latex-fizačného testu	241
Hocmanová M., Krčméry V.: Využitie telluritovej reduktázy <i>Mycobacterium avium</i> pre ich diferenciaciu	247
Churý J., Pánek K.: Vliv jednostranného krmení vojteškou na hypofýzu, ovarium, uterus a nadledvinku morčete	253
Šimková A., Šimek L., Lanc A.: Výsledky pokusů o odchov bezmikrobních (germfree) kuřat	261
Hynek B., Keil M.: Hodnocení a identifikace některých tkání změnami průtoku elektrického proudu, vedeného oběma směry	271

СОДЕРЖАНИЕ

Спурны О., Сурынек Й.: Уровень кетонových веществ и жирных кислот в крови дойных коров в предвесенний и весенний периоды (231). — Влчек Й., Герзиг И.: Действие экстрагированной ксиленом рыбной муки на состояние здоровья и органолептические свойства мяса и сала свиней (239). — Итзе Л., Арендарчик Й.: К вопросу изучения антигонадотропной сыворотки при помощи латекс-фиксирующего теста (245). — Гоцманова М., Крчмери В.: Использование теллуритовой редуктазы *Mycobacterium avium* для их дифференциации (251). — Хуры Я., Пáнек К.: Влияние одностороннего кормления люцерной на гипофиз, яичники, матку и надпочечник морской свинки (259). — Шимкова А., Шимек Л., Ланц А.: Результаты опытов и выращивание безмикробных (germfree) цыплят (269). — Гинек Б., Кейл М.: Оценка и идентификация некоторых тканей и веществ путем изменения течения электрического тока, идущего в двух направлениях (278).

CONTENT

Spurný O., Surynek J.: The Level of Ketone Substances and Fatty Acids in Blood of Milch-Cows in the Early Spring and Spring (232). — Vlček J., Herzig I.: Effect of Fish-Meal Extracted by Xylene on the Health Condition and Organoleptical Properties of Meat and Fat of Pigs (239). — Itze L., Arendarčík J.: On the Studying of Antigonadotropical Serum by means of the Latex-Fixation-Test (246). — Hocmanová M., Krčméry V.: Utilization of Tellurite Reductase of *Mycobacterium avium* for its Differentiation (251). — Churý J., Pánek K.: Influence of One-Sided Lucerne Feeding on Hypophysis, Ovaries, Uterus, and Suprarenal Glands of Guinea-Pigs (259). — Šimková A., Šimek L., Lanc A.: The Results of Attempts at rearing Germfree Chickens (269). — Hynek B., Keil M.: Evaluation and Identification of some Tissues and Substances by means of Changes of Electric Current Passage conducted in both Directions (278).

INHALT

Spurný O., Surynek J.: Ketonstoffe- und Fettsäurenspiegel im Blut der Milchkühe in der Vorfrühlings- und Frühlingsperiode (232). — Vlček J., Herzig I.: Wirkung des mit Xylen extrahierten Fischmehls auf den Gesundheitszustand und die organoleptischen Eigenschaften des Fleisches und Fettes der Schweine (239). — Itze L., Arendarčík J.: Beitrag zum Studium des antigonadotropen Serums mit Hilfe des Latex-Fixationstestes (246). — Hocmanová M., Krčméry V.: Die Anwendung von Tellurit-Reduktase des My-

cobacterium avium für seine Differenzierung (252). — Churý J., Pánek K.: Einfluß der einseitigen Verfütterung von Luzerne auf die Hypophyse, Ovarien, den Uterus und auf die Nebeniere des Meerschweinchens (259). — Šimková A., Šimek L., Lanc A.: Forschungsergebnisse und Aufzucht von keimlosen (germfree) Kücken (269). — Hýnek B., Keil M.: Bewertung und Identifikation einiger Gewebe und Stoffe durch Veränderungen des Durchflusses des nach beiden Richtungen geleiteten Stroms (278).

TABLE DES MATIÈRES

Spurný O., Surynek J.: Niveau des matières cétoniques et des acides gras dans le sang des vaches laitières dans la période vernale et prévernale (res. An/232, Al/232). — Vlček J., Herzig I.: Action de la farine de poisson extraite par xylène sur l'état sanitaire et les propriétés organoleptiques de la viande et de la graisse des porcs (res. An/239, Al/239). — Itze L., Arendarčík J.: Contribution à l'étude du sérum antigonadotrope au moyen du test de fixation du latex (res. An/246, Al/246). — Hocmanová M., Krčmery V.: Utilisation de la réductase telluritique de *Mycobacterium avium* pour la différenciation de ces derniers (res. An/251, Al/252). — Churý J., Pánek K.: Influence de la nourriture uniforme — la luzerne — sur l'hypophyse, l'ovaire, l'utérus et les surrénales du cobaye (res. An/259, Al/259). — Šimková A., Šimek L., Lanc A.: Résultats des essais concernant l'élevage indemne de microbes (res. An/269, Al/269). — Hýnek B., Keil M.: Evaluation et identification de certains tissus et matières par des modifications du débit du courant électrique conduit dans les deux sens (res. An/278, Al/278).