

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

2

ROČNÍK 13 (XL)
PRAHA,
ÚNOR 1967
CENA 10 Kčs

ÚSTAV
VĚDECKOTECHNICKÝCH
INFORMACÍ MZLH

Řídí 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 1966

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, Слезская 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 Fortswirtschaft. 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 la 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

■ V humánní medicíně je věnována hladinám cholesterolu v krevním séru pozornost zvláště v souvislosti s množstvím a druhem tuku v potravě. Existuje totiž domněnka, že nadbytek tuku, zvláště živočišného původu, úzce souvisí s výskytem atherosklerosy (Mašek 1962). Při jeho menším příjmu se vyskytuje i nižší cholesterolémie.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

U prasat vyvolala intenzivnější výzkum metabolismu lipidů jednak vhodnost tohoto živočišného druhu pro studium arteriálních chorob (Howard a kol. 1962, 1965), jednak potřeba vhodně složeného náhradního mléka pro selata. Sheffy a kol. (1951) i Nelson a kol. (1952) ukázali na životní důležitost tuku pro nejmladší selata a na příznivý účinek fosfolipidů v redukci výskytu průjmů. V další práci Sheffy a kol. (1952) analyzovali tuk v mléce prasníc a poznali, že se svým složením podobá sádlu. Peo a kol. (1957) a podobně též Leat a kol. (1962) nezjistili signifikantní rozdíly ve váhových přírůstcích ve vztahu k obsahu tuku v krmivu; přídavky tuku však zlepšily vzhled prasat a stav kůže.

Po zařazení tuků do krmné dávky zjistili Barnes a kol. (1961) vyšší výskyt sérového cholesterolu. Z práce Howarda a kol. (1965) vyplývá, že u běhounů v jatečné váze jsou jeho hladiny vyšší při zkrmování loje než kukuřičného oleje. Kábrt a kol. (1961) zaznamenali nestálost cholesterolémie i při vyrovnané krmné dávce a vzestup po infekci virem obrny prasat.

Je známé, že koncentrace cholesterolu je poměrně vysoká v nadledvinách. Prudké snížení při zvýšené kortikální aktivitě demonstroval Long (1947). Conn a kol. (1950) vyslovili domněnku, že krev je významným zdrojem cholesterolu pro kůru nadledvin je-li žádoucí tvorba větších množství steroidních hormonů. Později bylo potvrzeno, že cholesterol je skutečně jejich prekurorem (Wettstein 1961, Sandor a kol. 1965, Dorfman a Sharma 1965).

Vedle dietních vlivů a účinků stresových stavů jsou u lidí udávány difference v hodnotách cholesterolu vzhledem ke stáří (Muller 1945, Melichar a kol. 1965, Jakovcic 1965). V dostupné literatuře jsme nenašli údaje o sérovém cholesterolu u selat ani o vlivech různých faktorů na jeho hladinu. Dále uvedená data ukazují, že u těchto zvířat též existují věkové rozdíly a je sledováno do jaké míry mohou být ovlivněny činností kůry nadledvin.

MATERIÁL A METODY

Ke studiu cholesterolémie bylo použito 267 selat a 29 běhounů bílého ušlechtilého plemene. Zvířata byla chována v letech 1963–1965 ve stájích ústavu. Krmná dávka prasnic sestávala v podstatě z ovesného a ječného šrotu, otrub, bramborových vloček, bílkovinné směsi, případně sušeného odstředěného mléka. Tatáž krmiva byla používána i v příkrmování selat a po jejich odstavu, který byl prováděn ve stáří 32–53 dní. Ze sledování byla vyloučena zvířata se zpožděným růstem a klinickými příznaky onemocnění.

Sérum bylo získáváno po odběru krve z *V. cava cran.*, u větší části selat opakovaně v různém věkovém údobí. Při sledovaném účinku stresu na hladinu sérového cholesterolu byl použit odběr asi 15 ml krve z *V. cava cran.*, a to celkem u 41 zvířat. U 36 dalších byl sledován vliv ACTH po *i. m.* aplikaci Corticotrophinu retard Spofa v dávce 2 j./kg ž. v. V jiném pokusu byl 6 odstaveným selatům 2 vrhů injikován *i. m.* prednisolon Hoechst-Hostacarin H po 2 mg/kg ž. v. denně 8 po sobě jdoucích dnů, počínaje 52. nebo 55. dnem stáří. Cholesterol byl stanoven současně u stejného počtu kontrol těchže vrhů po 6. dávce a za 2 dny po poslední. Decorton Spofa byl podáván 6 sajícím selatům 2 vrhů po 4 dny v denní dávce 1 mg desoxycorticosteronu-acetátu *i. m.* na kg ž. v. počínaje 36. nebo 28. dnem po narození. Cholesterolémie byla zjišťována při poslední aplikaci současně se stejným počtem kontrolních zvířat těchže vrhů. Ve všech případech byla krev odebírána mezi 7–8 hodinou ráno, nebo v tuto dobu začínalo sledování účinku testů.

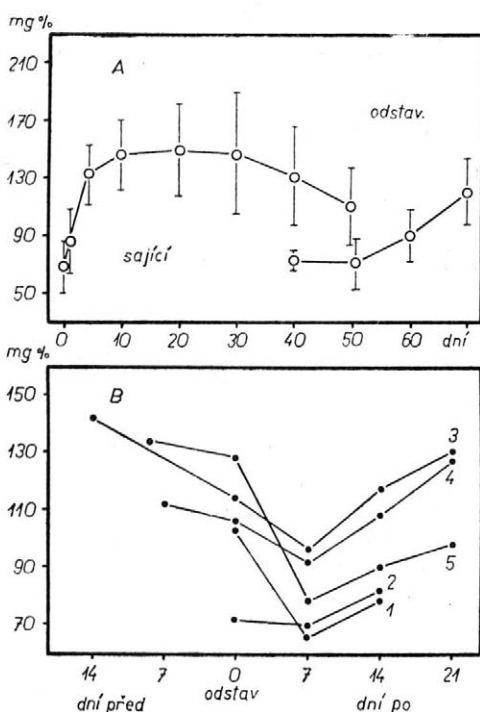
Celkový cholesterol v krevním séru byl určován v den odběru krve metodou podle Pearsona a kol. (1953) s nahrazením kyseliny p-toluensulfonové sulfolalicylovou podle Továřka (ústní sdělení). Získané výsledky jsou vyhodnoceny běžnými statistickými metodami; k průkaznosti rozdílů byl použit *t* test.

VÝSLEDKY

Při studiu věkových rozdílů v cholesterolémii bylo provedeno celkem 699 analýz krevního séra. U běhounů v jatečné váze bylo zjištěno $130,7 \pm 14,2$ mg %. Změny k jakým dochází v hladinách cholesterolu u sajících i odstavených selat jsou znázorněny na grafu 2 A. S výjimkou prvé hodnoty, zjištěné u 15 novorozených selat před napitím mležíva, a hodnoty ve stáří 36–40 dní, zjištěné u 8 selat 4–6 dní po odstavu, byly v každé věkové skupině průměry a uvedené směrodatné odchylky vypočítány na základě vyšetření 45–135 vzorků. Až do stáří 4–10 dní se cholesterolémie novorozených selat prudce zvyšovala. Rozdíly mezi průměry navzájem jsou statisticky průkazné až vysoce průkazné. K výraznému snížení u sajících došlo po 40. dni stáří. Časný odstav vyvolal další velký pokles. Sérový cholesterol dosáhl pak hladiny zjištěné ke konci údobí sání až ve stáří 61–70 dní a nelišil se významně od hladin stanovených u běhounů v jatečné váze. Ve všech skupinách byl rozptýl individuálních hodnot značný. Nebyl pozorován vztah k váze selat určitého stáří.

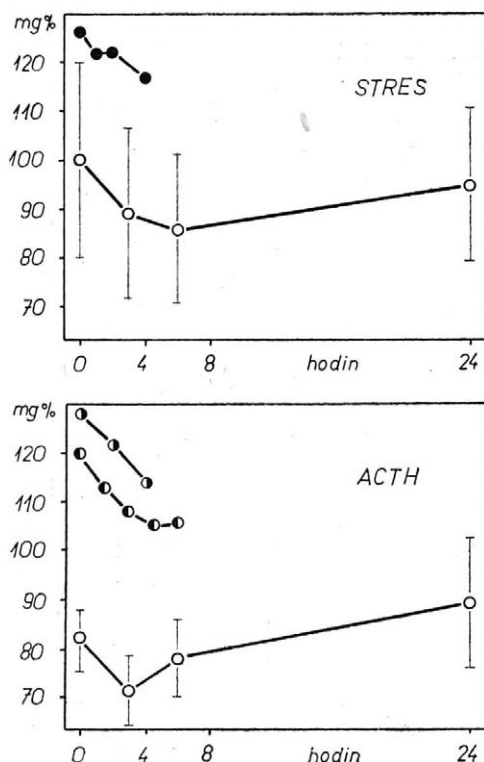
Vliv odstavu 5 vrhů s 5–10 selaty je demonstrován v grafu 1 B. Lze pozorovat, že některé vrhy si uchovávají stále poměrně vyšší hodnoty sérového cholesterolu, jiné pak nižší. Počet selat na to neměl vliv. Jednoznačně u všech došlo v prvním týdnu po odstavu ke snížení hladin, a to o 2,6–50,0 mg % cholesterolu. Odstav byl proveden počínaje č. 1 ve stáří 38, 42, 46, 40 a 37 dní. Maximální pokles byl u 5. vrhu, nejdříve odstaveného; průměrná váha selat

byla 8,21 kg. Je zajímavé, že z vrhu č. 1, 3 a 5, u nichž došlo k největšímu snížení, uhynulo po odstavu po jednom seletu na colienterotoxémii. Též u dvou selat jiných, u nichž ve stáří 53 dní, za týden po odstavu byly zjištěny minimální hladiny cholesterolu z celého věkového souboru (42 a 52 mg%), došlo za 1–2 dny poté k exitu na tuto chorobu.



Graf 1. A – Sérový cholesterol vyjádřený průměrnými hodnotami a směrodatnými odchylkami u sajících a odstavených selat.

B – Vliv odstavy ve stáří 37–46 dní na hladinu sérového cholesterolu u 5 vrhů selat.



Graf 2. Účinek stresu vyvolaného opakovanou vénepunkcí na sérový cholesterol selat starých 30 dní (vyplněné značky) a 51–54 dní (prázdné značky).

Dole: Účinek Corticotrophinu retard na sérový cholesterol 3 skupin selat starých 1–3 měsíce.

Stres vyvolaný jednorázovým odběrem krve z *V. cava cran.* způsobil za 4 hodiny u 15 selat starých 3–10 dní snížení sérového cholesterolu pouze o 3 mg%, u 11 selat ve stáří 22–42 dní o 7 mg%. Venepunkce opakované třikrát v 1–3hodinových intervalech měly za následek výraznější snížení zaznamenané v grafu 2, které u 10 odstavených selat ve stáří 51 nebo 54 dní činilo v průměru 15 mg%.

Výsledky s aplikací ACTH jsou u 3 skupin uvedeny v dolní části grafu 2. Sérový cholesterol se snížil o 11–15 mg%. Rozdíl mezi výchozí a minimální hodnotou byl statisticky průkazný pouze u skupiny 7 odstavených selat sledovaných 24 hodin ve stáří 47–51 dní. Podobně u čtvrté skupiny, odstavených selat, bylo v průměrném stáří 41 dní zaznamenáno snížení hladiny o 13 mg% 4 hodiny po aplikaci kortikotropního hormonu, a to z výchozích $83,1 \pm 25,5$ na $70,0 \pm 19,5$ mg%.

Osmidenní parenterální aplikace prednisolonu signifikantně zvýšila sérový cholesterol stanovený u selat 14.—21. den po odstavu. Bylo zjištěno $216,6 \pm 71,4$ mg%, zatím co u kontrolních bylo $105,8 \pm 24,6$ mg%. Při 4. injekci desoxycorticosteronu-acetátu byla cholesterolemie u další skupiny selat $170,3 \pm 35,6$ mg% a u kontrol $150,3 \pm 35,2$ mg%. Rozdíl nebyl statisticky průkazný.

DISKUSE

Nejvýraznější vlivy na sérový cholesterol selat jsou bezesporu spojeny s jejich stářím. Ve srovnání s hodnotou, kterou jsme zjistili u běhounů v jatečné váze a která se shoduje s hodnotami stanovenými Kábrtem a kol. (1961) i Howardem a kol. (1965), je cholesterolemie u sajících selat signifikantně nižší v den po narození a ve stáří 41—50 dní, jakož i ve stáří 36—60 dní po časném odstavu. Průkazně vyšší hladiny pak byly zaznamenány 4.—30. den po narození. Naše poznatky o nízkých hodnotách u novorozených selat se tak shodují s výsledky zjištěnými nejen u dětí (Muller 1945, Melichar a kol. 1965, Jakovcic 1965), ale i u telat (Zaletel a kol. 1952, Dvořák 1965).

Vliv tuku v potravě, který se u telat projevuje podstatně vyššími hladinami sérového cholesterolu (Jacobsen a kol. 1953, Dvořák 1965), jsme experimentálně nesledovali. Dá se o něm usuzovat nepřímě z hodnot zjištěných u sajících i odstavených selat se zřetelem na množství tuku přijímaného v určitém věku s potravou. Tak podle Scheffyho a kol. (1952) obsahuje mlezivo prasnice 11,52 a mléko 30. den 8,73 % tuku. U časně odstavených selat, která dostávala odstředěné mléko, pak byl příjem tuku minimální. Poměrné zastoupení tuků v mléce a příkrmu podávaném selatům různého stáří, jak je demonstruje Holub (1962), má až do 60 dní stáří podobný klesající trend jako křivka cholesterolu (graf 1 A).

Stres vyvolaný u selat venepunkcí, který působí zvýšené vylučování ACTH (Novák a Sejkorová 1963), jakož i přímé podávání kortikotropního hormonu, měly za následek snížení hladiny celkového cholesterolu. Shoduje se to s poznatky, které učinili Conn a kol. (1950) a aplikací ACTH lidem a Kuhl a kol. (1952) po vystavení mladých lidí chladovému stresu. Naproti tomu Dreyfus a Czaczkes (1959) zjistili při psychické stresové situaci zvýšenou cholesterolemii. Poznamenávají, že sérový cholesterol se po aplikaci ACTH může chovat různě, v závislosti též na živočišném druhu. Zvýšené hladiny u lidí a králíků po podávání adrenokortikálních hormonů kortisonu, hydrokortisonu nebo prednisolonu zjistili Adlersberg a kol. (1950), Chun-I-Wang a kol. (1955), Forbes a kol. (1962) a Friedman a kol. (1965). Poslední uvádějí, že mechanismus je neznámý; současně dochází ke zvýšení plazmatických lipidů. Na základě vlastních pokusů se kloní k názoru, že kortison vyvolává hypercholesterolemii pouze nepřímě v důsledku dostatečného stupně předcházející hyperglyceridémie, která pramení z části z relativní neschopnosti jater odstranit triglyceridy z plazmy.

Je zřejmý vztah hormonů kůry nadledvin k metabolismu lipidů a cholesterolu. Uvážíme-li, že v našich pokusech došlo při stresu, při kterém nastává zvýšená tvorba kortikosteroidů, ke snížení hladin, a při exogenním podání tohoto hormonu (prednisolonu), který pak omezuje endogenní tvorbu, ke zvýšení, nelze se ubránit dojmu, že cholesterol zde hraje úlohu prekursoru kortikosteroidů ve smyslu domněnky Conna a kol. (1950). Při jejich větší produkci se cholesterolemie snižuje, při menší zvyšuje. Tomu odpovídá též námi zjištěné zvýšení hladiny u adrenalektomovaných selat.

Je možné, že hypocholesterolemie zjišťovaná po odstavu selat není způsobena

jen sníženým příjmem tuku v potravě, případně látkami, o nichž je známo, že snižují hladinu cholesterolu v krvi (Pekárek 1964), ale že mohou spolupůsobit též stresové situace, které jsou s odstavem spojeny.

Jedním z inhibitorů biosyntézy cholesterolu je tripanol. Gordon a kol. (1963) jeho zkrmením krysám snížili koncentraci sterolu nejen v plazmě, ale též v játrech a nadledvinách. Váha nadledvin byla zvýšená a koncentrace kortikosteronu v odpovědi na ACTH byla redukována ve výtoku z obou adrenálních žil, i v nadledvinách. Toto narušení adrenální funkce ve spojení se sníženými hladinami cholesterolu vyvolává otázku, zda jeho nízké hodnoty zjištěné u odstavených selat nemají negativní vliv na adrenokortikální aktivitu. Právě u odstavených selat bývá zjišťována colienterotoxémie, jejíž patogeneze není bezpečně známa. Lewis a Page (1948), Tauber a Garson (1958) a další zjistili obrannou schopnost adrenálních extraktů a steroidů proti některým bakteriálním toxinům, a při léčbě colienterotoxémie jsou kortikosteroidy indikovány.

Z klinického hlediska je sérový cholesterol používán za dobrý index metabolismu tuků (Muller 1945). Zda mu lze v širokém komplexu faktorů působících na jeho hladinu přiznat u selat tutéž hodnotu ve vztahu k funkci kůry nadledvin, není možné zatím spolehlivě odpovědět. Charvát a kol. (1950) jej považovali za vhodné kritérium při zkoušení její funkční zdatnosti u lidí. Hypcholesterolémie, jako projev úsilovné činnosti kůry nadledvin na jedné straně, jakož i možný její vliv na redukcii tvorby kortikosteroidů, však nelze podceňovat.

SOUHRN

Vyšetřením 267 selat bylo zjištěno, že stáří, případně faktory s určitým věkem spojené, mají výrazný vliv na sérový cholesterol. Ve srovnání s hodnotami zjištěnými u 29 běhounů v jatečné váze (130 ± 14 mg%) byly jeho hladiny signifikantně sniženy v den narození (68 ± 18 mg%) a po 40. dnu, jakož i po časném odstavu (70 ± 18 mg%). Signifikantně vyšší byly ve stáří 4–30 dní (146 ± 25 až 149 ± 32 mg%).

Bylo ukázáno přechodné snížení cholesterolu po stresu vyvolaném věnepunkcí a po aplikaci ACTH. Významné zvýšení nastalo po opakované aplikaci prednisolonu (216 ± 71 mg%).

Práce upozorňuje na možný vztah hypcholesterolémie odstavených selat k adrenokortikální aktivitě se zřetelem k výskytu colienterotoxémie.

Došlo dne 27. 5. 1966

Technická spolupráce H. Hornichová a E. Adamíková.

Literatura

1. ADLERSBERG, D. - SCHAEFER, L. E. - DRITCH, R.: Studies on hormonal control of serum lipid partition in man. = „J. Clin. Endocrinol.“, 10, 1950 : 814. — 2. BARNES, R. H. - KWONG, E. - MATTICK, L. R. - LOOSLI, J. K.: Isomerized fat and serum cholesterol in swine. = „Proc. Soc. Exper. Biol. Med.“, 108, 1961 : 468–471. — 3. CONN, J. W. - VOGEL, W. C. - LOUIS, L. H. - FAJANS, S. S.: Serum cholesterol: a probable precursor of adrenal cortical hormones. = „J. Lab. Clin. Med.“, 35, 1950 : 504–517. — 4. DORFMAN, R. I. - SHARMA, D. C.: An outline of the biosynthesis of corticosteroids and androgens. = „Steroids“, 6, 1965 : 229. — 5. DREYFUSS, F. - CZACZKES, J. W.: Blood cholesterol and uric acid of healthy medical students under the stress of an examination. = „Arch. Int. Med.“, 103, 1959 : 708–711. — 6. DVORÁK, M.: Celkové lipidy a cholesterol v krevním séru telat s odlišným příjmem mléčného tuku. = „Vědec. práce VÚVL“, 4, 1965 : 49–58. — 7. FORBES, J. C. - HIGGINS, E. S. - PETTERSON, O. M.: Effect of glucocorticoids on serum cholesterol and triglyceride distribution. = „Metabolism“, 11, 1962 : 1232–1239. — 8. FRIEDMAN, M. - VAN DER BOSCH, J. - BYERS, S. O. - ST. GEORGE, S.: Effects of cortisone on lipid and cholesterol metabolism in the rabbit and rat. = „Amer. J. Physiol.“, 208, 1965 : 94–105. — 9. GORDON, S. - MANER, S. - CEHLENIK, W. P. - PARTRIDGE, R.: Mechanism of tripanol-induced adrenal hypertrophy and

reduced adrenal function. = „Endocrinology“, 72, 1963: 643-648. — 10. HOLUB, A.: Kvantitativní poměry ve výživě selat v době sání. = „Vet. med.“, 7, 1962: 711-724. — 11. HOWARD, A. N. - LEAT, W. M. F. - GRESHAM, G. A. - BOWYER, D. E. - JENNINGS, I. W.: Pathological and biochemical changes in pigs given semi-synthetic diets containing no fat, beef tallow and maize oil. = „Proc. Nutr. Soc.“, 21, 1962: XXXVI-XXXVII. — 12. HOWARD, A. N. - LEAT, W. M. F. - GRESHAM, G. A. - BOWYER, D. E. - DALTON, E. R.: Studies on pigs reared on semi-synthetic diets containing no fat, beef tallow or maize oil: husbandry and serum biochemistry. = „Brit. J. Nutr.“, 19, 1965: 383-395. — 13. CHARVÁT, J. - CHYTIL, F. - KANDRÁČ, M. - SOYKA, O. - ŠONKA, J.: Studie o adrenokortikotropním hormonu. = „Sborník léc.“, 52, 1950: 51-90. — 14. CHUN-I-WANG - BOSSAK, E. T. - ADLERSBERG, D.: Prednisone and plasma lipids. = „J. Clin. Endocrinol. Metab.“, 15, 1955: 1308-1310. — 15. JACOBSON, N. L. - ZALETEL, J. H. - ALLEN, R. S.: Effect of various dietary lipids on the blood plasma lipids of dairy calves. = „J. Dairy Sci.“, 36, 1953: 832-842. — 16. JAKOVČIC, S.: Lipid metabolism in the developing fetus and the newborn. = „Pediat. Clin. N. Am.“, 12, 1965: 585-594. — 17. KÁBRT, J. - LEBEDA, M. - MEŠÁROŠ, E. - OPLIŠTIL, M.: Vliv vyrovnané a deficientní výživy na průběh nakažlivé obrny prasat (Kloboukovy nemoci). = „Vet. med.“, 6, 1961: 24-34. — 18. KÜHL, W. J. - WILSON, H. - ROLLI, E.: Measurements of adrenal cortical activity in young men subjected to acute stress. = „J. Clin. Endocrinol. Metab.“, 12, 1952: 398-406. — 19. LEAT, W. M. F. - CUTHBERTSON, A. - HOWARD, A. N. - GRESHAM, G. A.: Distribution and fatty acid composition on depot fat of pigs reared on synthetic diets with and without fat. = „Proc. Nutr. Soc.“, 21, 1962: XXXV-XXXVI. — 20. LEWIS, L. A. - PAGE, I. H.: Further studies on the protective power of adrenal extract and steroids against toxic agents. = „Endocrinology“, 43, 1948: 415-421. — 21. LONG, C. N. H.: The relation of cholesterol and ascorbic acid to the secretion of the adrenal cortex. = „Rec. Progr. Horm. Res.“, 1, 1947: 99-122. — 22. MASEK, J.: Naše výzkumné výsledky a perspektiva sledování úlohy tuků ve výživě. = „Čs. gastroenterol.“, 16, 1962: 163-170. — 23. MELICHAR, V. - NOVÁK, P. - NOVÁK, M. - HAHN, P. - KOLDOVSKÝ, O.: Blood cholesterol levels in newborn infants and adults in Ulan Bator (Mongolia) and Prague (Czechoslovakia). = „Nutr. Dieta“, 7, 1965: 191-195. — 24. MULLER, G. L.: The clinical significance of cholesterol. = „Am. J. Digest. Dis.“, 12, 1945: 355-377. — 25. NELSON, L. F. - ASHTON, G. C. - MADDOCK, H. M. - CATRON, D. V.: Studies on fat and solids levels and length of feeding period of synthetic milk for baby pigs. = „J. Animal Sci.“, 11, 1952: 771. — 26. NOVÁK, J. - SEJKOROVÁ, J.: Odběr krve jako stress. II. Glukokortikoidové změny v hemogramu při odběru krve. = „Vniř. léc.“, 9, 1963: 664-672. — 27. PEARSON, S. - STERN, S. - MCGAVACK, T. H.: A rapid, accurate method for the determination of total cholesterol in serum. = „Analyt. Chem.“, 25, 1953: 813-814. — 28. PEKÁREK, O.: Látky snižující hladiny cholesterolu v krvi. = „Farmakoterap. zprávy Spofa“, 5-6, 1964: 819-820. — 29. PEO, E. R. - ASHTON, G. C. - SPEER, V. C. - CATRON, D. V.: Protein and fat requirements of baby pigs. = „J. Animal Sci.“, 16, 1957: 885-891. — 30. SANDOR, T. - LAMOURFUEX, J. - LANTHIER, A.: Adrenal cortical function in birds. The in vitro transformation of sodium acetate-1-¹⁴C and cholesterol-4-¹⁴C by adrenal glands preparations of the domestic duck and the goose. = „Steroids“, 6, 1965: 143-157. — 31. TAUBER, H. - GARSON, W.: Effect of cortisone, properdin and reserpine on *Neisseria gonorrhoeae* endotoxin activity. = „Proc. Soc. Exper. Biol. Med.“, 97, 1958: 886-888. — 32. SHEFFY, B. E. - GALLEGOS, C. A. - GRUMMER, R. H. - PHILLIPS, R. H. - BOHSTED, G.: The effect of particle size and phospholipid on growth and fat utilization of the baby pig. = „J. Animal Sci.“, 10, 1951: 867-874. — 33. SHEFFY, B. E. - PHILLIPS, P. H. - DYMSZA, H. A. - GRUMMER, R. H. - BOHSTEDT, G.: Fat, fat constants, and phospholipid content of sow's milk. = „J. Animal Sci.“, 11, 1952: 927-935. — 34. WETTSTEIN, A.: Biosynthèse des hormones stéroïdes. = „Experientia“, 17, 1961: 329-344. — 35. ZALETEL, J. H. - ALLEN, R. S. - JACOBSON, N. L.: Lipids in blood plasma of young dairy calves. = „J. Dairy Sci.“, 35, 1952: 1046-1052.

Уровни холестерина сыворотки поросят в зависимости от возраста и аденокортикальной активности

В результате обследования 267 порослят установлено, что возраст или же некоторые связанные с определенным возрастом факторы оказывают отчетливое влияние на холестерин сыворотки. По сравнению с величинами убойного веса (130 ± 14 мг%), установленными

у 29 подсвинков, уровень сыровоточного количества был значительно ниже в день рождения (68 ± 18 мг%) и спустя 40 дней, а также после раннего отъема (70 ± 18 мг%). Его уровень был достоверно выше в возрасте 4–30 дней (146 ± 25 до 149 ± 32 мг%).

Обнаружено временное снижение холестерина после стресса, вызванного уколом в вену, и после АСТН. Отчетливое повышение было обеспечено после повторного введения преднизолона (216 ± 71 мг%).

Указано на возможную зависимость между гипохолестеремией поросят-отъемышей и адренокортикальной активностью с учетом наличия колиентеротоксемии.

The Serum Cholesterol Level in Piglets in Relation to Age and to the Adrenocortical Activity

Examination of 267 piglets showed that age or factors connected with a certain age have a pronounced influence on serum cholesterol. Compared with the values found in 29 stores of killing weight (130 ± 14 мг%) its levels were significantly lower on the day of birth (68 ± 18 мг%) and after the 40th day of life as well as after early weaning (70 ± 18 мг%). They were significantly higher at the age of 4–30 days (146 ± 25 to 149 ± 32 мг%).

A temporary decreasing of cholesterol was found after stress caused by venepuncture and after application of ACTH. A significant rising occurred after repeated application of prednisolon (216 ± 71 мг%).

The author draws attention to the possible relation between the hypocholesterolemia of weaned piglets and the adrenocortical activity with regard to the occurrence of colienterotoxemia.

Das Serumcholesterollniveau bei Ferkeln in Beziehung zum Alter und zur adrenokortikalen Aktivität

Durch die Untersuchung von 267 Ferkeln wurde festgestellt, daß das Alter, eventuell die mit einem gewissen Alter verbundenen Faktoren einen bedeutenden Einfluß auf das Serumcholesterol ausüben. Im Vergleich mit Werten, die bei 29 Läufern im Schlachtgewicht (130 ± 14 мг%) festgestellt wurden, waren seine Niveaus am Tage der Geburt (68 ± 18 мг%) und nach dem 40. Tage signifikant herabgesetzt. Dies war auch der Fall nach dem früheren Absetzen (70 ± 18 мг%). Signifikant höher waren sie im Alter von 4–30 Tagen (146 ± 25 bis 149 ± 32 мг%).

Es wurde auf eine vorübergehende Herabsetzung des Cholesterolgehaltes nach dem Stress, der mittels der Venepunktion hervorgerufen wurde und nach der Applikation des ACTH, aufmerksam gemacht. Eine bedeutende Erhöhung trat nach einer wiederholten Applikation von Prednisolon (216 ± 71 мг%) ein.

Es wurde auf die Möglichkeit einer Beziehung der Hypocholesterolanämie der abgesetzten Ferkel zur adrenokortikalen Aktivität mit Rücksicht auf das Vorkommen der Colienterotoxämie aufmerksam gemacht.

Adresa autora:

MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno - Medlánky, ředitel Doc. Dr. Ing. Jan Vlček

MALÉ INFORMACE

● 18. Světový veterinární kongres

Datum a místo: 17. a 22. července 1967, Paříž

Informace: Prof. R. Vuillaume, World Veterinary Association, 27, rue des Petits-Hôtels, Paris 10e

Současně s tímto kongresem se pořádají následující konference a sjezdy:

4. Konference Světové asociace veterinárních lékařů specialistů pro drůbež

Informace: Dr. P. Philip Levine, State University of New York, Veterinary College, Ithaca NY 14851

1. Sjezd Světové asociace veterinárních mikrobiologů

Informace: Prof. A. R. Willems, Casinophlein 21, Gent (Belgie)

8. Sjezd veterinárních anatomů

Informace: Prof. R. Barone, Ecole Nationale Vétérinaire, 2 quai Chauveau, Lyons

● Slovenské vydavateľstvo poľnohospodárskej literatúry Bratislava

nám zaslalo

● Ing. Jozef Mrakič: Velkovýrobné formy organizácie práce v chove ošipáných

Kniha má 191 stran a je vybavena četnými tabulkami a grafy, cena 8,50 Kčs. Publikace probírá otázky, které se vyskytují při uplatňování směnového provozu v chovu prasat a na příkladech z praxe poukazuje na ekonomické a sociální přednosti takové organizace práce.

● Doc. Ing. Prokop Juráček: Svet v boji proti hladu

Kniha má 235 stran a četné přehledné tabulky. Obálku a frontispicie k jednotlivým kapitolám navrhl Milan Lahula, cena Kčs 9,50

Kniha se zabývá v současné době velmi aktuální otázkou: Hrozí lidstvu ze současné populační exploze a z dosavadního uspořádání — neuspořádání vztahů mezi sytými a hladovými — v rozsahu jednotlivých zemí i uvnitř každé jednotlivé — hlad — nebo je lidstva schopno zvládnout tento problém? Kniha, odpovídající na tuto otázku vědecky, nemůže odpovědět jinak než kladně — ne dnešní 3,3 miliardy lidí, ale i 15 miliard a více může zeměkoule vyživit, bude-li využito jen dnešních vědeckých poznatků, nehledě k budoucím.

● Nakladatelství Elsevier Publishing Company, Amsterdam

nám zaslalo:

● Lexicon of Parasites and Diseases in Livestock

Kniha obsahuje latinský, anglický, francouzský, španělský, italský a německý seznam parazitů a chorob domácího zvířectva, jednak v systematickém, jednak v abecedním uspořádání podle jednotlivých jazyků.

Kniha má 1225 stran a stojí 20 holandských zlatých, nebo 22,50 záp.něm. marek.

E. Parráková
A. Sečkárová
V. Krčméry

VLASTNOSTI ENTEROBAKTÉRIÍ Z PROSTREDIA ZARIADENÍ ŽIVOČÍŠNEJ VÝROBY

I. CITLIVOSŤ NA TETRACYKLÍNOVÉ ANTIBIOTIKÁ
U ENTEROPATOGENNÝCH KMEŇOV *Escherichia coli*
Z PROSTREDIA VEĽKOCHOVOV V ZÁVISLOSTI
OD POUŽÍVANIA CTC V KRMIVÁCH

■ Používanie chlôltetracyklínu (CTC) ako krmného doplnku pre hospodárske zvieratá, najmä ošipané a hydinu, vedie podľa mnohých autorov k vzniku rezistentných populácií v črevnom trakte prikrmovaných zvierat (Goldberg 1959, Manton 1963). Iní autori nepozorovali zvýšenie celkovej mikrobiálnej rezistencie vyvolané antibiotikami v krmivách (Sarkisov 1965). V rámci komplexného výskumu zmien životného prostredia na vidieku vplyvom zavádzania veľkochovnej technológie v živočíšnej výrobe sledujeme výskyt a biologické vlastnosti vybraných patogénnych a podmienených patogénnych mikroorganizmov ako aj hygienické aspekty prikrmovania hospodárskych zvierat antibiotikami. Macúch, Hušťavová a kol. (neverejnené pozorovania) zistili prítomnosť biologicky aktívneho CTC v orgánoch a svaloch pokusných kurčiat prikrmovaných týmto antibiotikom. Podobné výsledky dosiahli aj iní autori (súborne Goldberg 1959).

V pokusoch *in vitro* sme zistili, že aj nízke, fyziologicky dosiahnuteľné koncentrácie tetracyklínov vyvolávajú pri dostatočnom počte kontaktov vysoký stupeň rezistencie u kmeňov *Escherichia coli* (Krčméry 1966). Preskúmali sme preto situáciu čo do výskytu rezistencie na tetracyklíny u kmeňov *E. coli* izolovaných z chovov, kde sa obligátne používajú krmivá obohatené CTC. V tejto informácii referujeme o výrazných rozdieloch v citlivosti enteropatogénnych kmeňov *E. coli*, izolovaných z fekálií zvierat v skúmaných chovoch a z okolitej pôdy, na tetracyklíny v závislosti na podávaní CTC v krmive.

MATERIÁL A METODIKA

V troch väčších závodoch živočíšnej výroby: kravíne, ošipárni a hydínarni, sa izolovalo z fekálií ako aj z pôdy v rôznych vzdialenostiach od objektov (podrobnejšie v inom oznámení) celkovo 4864 typických kmeňov *E. coli*. Použili sme bežné izolačné metódy a diferenciačné testy, vrátane cytochróm-oxydázového testu. Z týchto kmeňov patrilo 286 kmeňov k enteropatogénnym sérotypom. Enteropatogénne kmene *E. coli* sme podrobili testom na citlivosť voči antibiotikám pomocou testovacích diskov SEBAS (Dr. Wild, Basel). Súčasne sa testoval na citlivosť aj reprezentatívny súbor ostatných kmeňov *E. coli* z uvedených závodov. Najviac sme sa zamerali na štúdium citlivosti voči tetracyklínovým antibiotikám. Súčasne sa testovala citlivosť voči sulfonamidom, STM, chloramfenikolu, neomycínu, erytromycínu a nitrofuranom (najmä u kmeňov z chovu hydiny).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Výsledky citlivosti na CTC (plne sa zhodujú aj s výsledkami na OTC a tetracyklín) u enteropatogénnych kmeňov *E. coli* izolovaných z areálu kravína (v krmive sa antibiotiká nepoužívajú), chovu ošipáných a hydiny (v oboch týchto chovoch sa permanentne prikrmuje s CTC) sú shrnuté do tabuľky I. Z nich jednoznačne vyplýva rozhodujúci vplyv kŕmenia hospodárskych zvierat antibiotikami na výskyt rezistentných kmeňov. Treba zdôrazniť, že prevalencia rezistentných kmeňov *E. coli* netýka sa iba črevného traktu prikrmovaných zvierat, ale aj životného prostredia, a to zasa nielen bezprostredného okolia zvierat (hnoj, fekálie a podstielka), ale i vzdialenejšieho (pôda). V objekte, kde sa antibiotiká do krmiva nepridávali (kravín), bol CTC-rezistentný kmeň vzácnosťou. Naopak, a to najmä v hydínarni, premorenie ostatných skúmaných objektov rezistentnými kmeňmi bolo výrazne vysoké. Treba podotknúť, že úplne podobné pomery sme zistili aj u vyšetrených súborov kmeňov nepatogénnych *E. coli* v skúmaných troch objektoch.

I. Výskyt CTC-rezistentných enteropatogénnych *E. coli* v jednotlivých skúmaných chovoch

Prostredie	Kravín	Ošipareň	Hydináreň
	CTC sa nepodáva	CTC sa podáva	CTC sa podáva
Celkový počet izolovaných enteropatogénnych <i>E. coli</i>	107	101	78
Fekálie	57/2	57/44	45/44
Pôda	50/0	44/20	33/23

Čísla udávajú celkový počet izolovaných enteropatogénnych kmeňov *E. coli*, v zlomku sa nachádza počet CTC-rezistentných kmeňov
CTC = chlortetracyklín

Vo svetle zistených skutočností, týkajúcich sa tzv. infekčnej rezistencie (prenos rezistencie na antibiotiká z rezistentných enterobaktérií na citlivé, konjugáciou alebo transdukciou bakteriofágmi, pričom sa prenáša extrachromozonálne lokalizovaná genetická informácia rezistencie) bolo rozsiahlymi štúdiami v jednotlivých štátoch zistené, že *E. coli* je najrozšírenejším donorovým species v procese šírenia sa antibiotickej rezistencie touto cestou. Tetracyklínové antibiotiká sú, ako bolo zistené (Smith 1965), triggerovými antibiotikami v tomto procese. Najčastejšími akceptorovými kmeňmi infekčnej rezistencie je *Salmonella typhimurium* a *shigely*.

V tejto súvislosti je významný nález troch multirezistentných kmeňov *E. coli* vo fekáliách teliat z objektu v blízkosti ošipárne, v ktorej sme sledovali výskyt rezistentných enteropatogénnych kmeňov *E. coli*. Infekčnosť rezistencie týchto troch kmeňov, tj. ich schopnosť odovzdať faktory rezistencie iným bunkám pri spoločnej kultivácii, práve študujeme.

Podľa informácií o uvedených chovoch zvieratá nikdy neboli liečené tetracyklínovými antibiotikami. Niektoré zvieratá v kravíne, choré na mastitídu, boli liečené PNC-om a niektoré ošipané pri hnačkových ochoreniach chloramfenikolom.

Z našich výsledkov možno dedukovať jednoznačný determinujúci vplyv po-

dávania antibiotík pri výkrme hospodárskych zvierat na výskyt značného počtu antibiotiko-rezistentných enteropatogénnych kmeňov *E. coli* v bezprostrednom i vzdialenejšom prostredí chovov hospodárskych zvierat. Vo svetle najnovších poznatkov o tzv. infekčnej rezistencii na antibiotiká a jej šírení sa z jedných kmeňov enterobaktérií na druhé treba urýchlene študovať a riešiť otázky hygienického a epidemiologického významu tejto situácie v našich chovoch.

SÚHRN

U 286 enteropatogénnych kmeňov *E. coli* (celkove z 4864 kmeňov *E. coli*) izolovaných z fekálií a z pôdy v rôznej vzdialenosti v troch chovoch hospodárskych zvierat (kravín, ošipárení a hydínareň) bola zisťovaná rezistencia najmä na tetracyklínové antibiotiká (test — tabletami SEBAS, Dr. Wild, Basel, Švajčiarsko) v súvislosti so štúdiom vzťahu podávania CTC v krmivách a výskytu rezistentných enterobaktérií. Zistil sa jednoznačný vplyv kŕmenia hospodárskych zvierat antibiotikami na vznik značného počtu rezistentných mutantov *E. coli* v bezprostrednom (fekálie, podstielka) i vzdialenejšom prostredí (pôda) chovov. V kravíne, kde sa antibiotiká v krmivách zvieratám nepodávali, boli zo 107 izolovaných enteropatogénnych kmeňov *E. coli* iba 2 rezistentné na CTC. Západne iná situácia bola v chove ošipáných a hydiny, kde prevážna väčšina izolovaných enteropatogénnych kmeňov *E. coli* bola na CTC rezistentná. Podobný trend vykazovali aj ostatné kmene *E. coli* z uvedených troch chovov. Diskutuje sa o význame týchto zistení z hľadiska javov tzv. infekčnej rezistencie.

Došlo dňa 27. 6. 1966

Autori ďakujú za technickú spoluprácu technickej asistentke Márii Pappovej.

Literatúra

1. GOLDBERG, H. S.: Antibiotics, their chemistry and non-medical use. — Nostrand Co., Princetown, N. J., USA, 1959. — 2. MANTEN, A.: The non-medical use of antibiotics. — Bull. WHO 29, 1963: 387-396. — 3. SARKISOV, A. C.: Чувствительность к антибиотикам микроорганизмов патогенных для сельскохозяйственных животных и птиц. = „Antibiotiki“, 10, 1965: 76-78. — 4. KRČMERY, V., KELLEN, J., VÝMOLA, F.: Study of biochemically induced resistance to Oxytetracycline. = „J. Hyg. epid. microbiol.“ 10, 1965: 327-338. — 5. SMITH, H. S.: Observations on infective drug resistance in Britain. = „Brit. Med. Journ.“, 1, 29, I. 1966: 266-269. Vid tiež: ANDERSON, E. S.: Characterization of a transfer factor associated with drug resistance in *Salmonella typhi* murium. = „Nature“ 208, 1965: 843-849.

Свойства энтеробактерий из среды животноводческих объектов —

I. Чувствительность к тетрациклиновым антибиотикам энтеропатогенных штаммов *ESCHERICHIA COLI* из среды промышленного разведения в зависимости от применения CTC*) в кормах

У 286 энтеропатогенных штаммов *E. coli* (всего от 4864 штаммов *E. coli*), изолированных из фекалий и из помета в разной отдаленности в трех стадах сельскохозяйственных животных (в коровнике, свиноматке и птичнике), устанавливалась устойчивость в первую очередь к тетрациклиновым антибиотикам (тест-таблетками SEBAS, д-р Вильд, Базель, Швейцария) в связи с изучением зависимости между дозой CTC в кормах и наличием устойчивых энтеробактерий. Установлено сильное влияние кормления сельскохозяйственных животных антибиотиками на возникновение значительного количества устойчивых мутантов *E. coli* в стадах в непосредственно примыкающей среде (фекалии, подстилка) и в почвенной среде. В коровнике, где антибиотики не подавались с кормами, из 107 изолиро-

*) CTC = Хлортетрациклин

ванных энтеропатогенных штаммов *E. coli* было лишь 2 устойчивых к CTC. Абсолютно иная ситуация была в стадах свиней и птицы, где преобладающее количество изолированных энтерогенных штаммов *E. coli* было устойчивым к CTC. Подобной тенденцией обладали и остальные штаммы *E. coli* из упомянутых трех стад. Обсуждается значение этих наблюдений с точки зрения явлений так наз. инфекционной устойчивости.

The Characteristics of Enterobacteriaceae of the Environment of Establishments of Livestock Production

I. Sensitiveness to Tetracyclin Antibiotics of Enteropathogenic Strains of *ESCHERICHIA COLI* from the Environment of Large Breeding Enterprises in Dependence on the Application of CTC in Feeds

Of 286 enteropathogenic strains of *E. coli* (of a total of 4864 strains of *E. coli*) isolated from faeces and from soil at different distances in three animal breeding farms (cattle-farm, piggery, and poultry-farm) their resistance particularly to tetracyclin antibiotics (SEBAS test tables, Dr. Wild, Basel, Switzerland) was determined in connection with a study of the relations between the administration of CTC in feeds and the occurrence of resistant Enterobacteriaceae. There was found a pronounced influence of feeding the farm animals with antibiotics on the arising of a considerable number of resistant mutants of *E. coli* in the immediate (faeces, litter) and in the more distant environment (soil) of herds. In a cattle-farm where the animals received no antibiotics in their feeds, of 107 isolated enteropathogenic strains of *E. coli* only 2 were resistant to CTC. A principally different situation existed in the keeping of pigs and poultry, where a predominant majority of the isolated enteropathogenic strains of *E. coli* were resistant to CTC. A similar trend was shown also by the other strains of *E. coli* of the mentioned three animal farms. There is a discussion on the importance of this finding with regard to phenomena of the so-called resistance to infection.

Eigenschaften der Enterobakterien aus dem Milieu der Einrichtungen für tierische Produktion

I. Die Empfindlichkeit gegenüber die Tetrazyklin-Antibiotika bei enteropathogenen Stämmen der *Escherichia coli* aus dem Milieu der Großzucht in Abhängigkeit von der Benützung des CTC in den Futtermitteln

Bei 2886 enteropathogenen Stämmen der *E. coli* (insgesamt 4864 Stämmen der *E. coli*), aus Fäkalien und aus dem Boden in verschiedener Entfernung in drei Zuchten der landwirtschaftlichen Nutztieren (Kuhstall, Schweinestall und Geflügelhof) wurde die geringste Resistenz vor allem gegenüber die Tetrazyklin-Antibiotika festgestellt (und zwar mittels der Test-Tabletten SEBAS, Dr. Wild, Basel, Schweiz) im Zusammenhang mit dem Studium der Abhängigkeit der Verabreichung von CTC im Futter und des Vorkommen der resistenten Enterobakterien. Es wurde ein eindeutiger Einfluß der Fütterung der landwirtschaftlichen Nutztiere mit Antibiotika auf die Entstehung einer beträchtlichen Anzahl resistenter Mutanten der *E. coli* in unmittelbarer (Fäkalien, Stroh) und weiterer Umwelt (Boden) der Zuchten festgestellt. In einem Kuhstall, wo die Antibiotika an Tiere nicht im Futter verabreicht wurden, waren von 107 isolierten enteropathogenen Stämmen der *E. coli* nur zwei gegenüber CTC resistent. Eine grundsätzlich andere Situation konnte in der Schweine- und Geflügelhaltung verzeichnet werden, wo die Mehrheit der enteropathogenen Stämme der *E. coli* gegenüber CTC resistent waren. Einen ähnlichen Trend wiesen auch die übrigen Stämme der *E. coli* von den drei angeführten Zuchten auf. Es wird über die Bedeutung dieser Feststellungen vom Gesichtspunkt der Erscheinungen der sog. infektiösen Resistenz diskutiert.

Adresa autorov:

MUDr. Edita Parráková, CSc., Dr. Alice Sečkářová, Ing. Vladimír Krčmář, CSc., Výskumný ústav hygieny, Bratislava
Ideový vedoucí úkolu prof. Dr. P. Macúch.

■ Rozšíření infekční hepatitidy psů (*Hepatitis contagiosa canis HCC*) v našich chovech nás vedlo k vývoji specifické imunizace proti této chorobě. Pro pasivní imunizaci se u nás již běžně používá hyperimunní sérum, jehož ochranný účinek je však jen krátkodobý. Bylo nutno ověřit imunizační vlastnosti očkovacích látek pro aktivní imunizaci jak za experimentálních tak za terenních podmínek.

Vývoj aktivní imunizace proti *HCC* vedl od použití virulentních virových kmenů k modifikovaným a k vakcínám obsahujícím inaktivovaný virus *HCC*.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Mansi (1956) např. aplikoval plně virulentní virus *HCC* do konjunktiválního vaku štěňat. Poppensieck a spol. (1958) aplikoval virulentní virus *HCC* současně s hyperimunním sérem. Avšak oba tyto způsoby imunizace se nevěly.

Několika autorům se zdařila modifikace viru *HCC* a byla tak dána možnost úspěšné vakcinace psů živými avirulentními kmeny *HCC*, jako např. Emery a spol. (1958), Fieldsteel a spol. (1957), Cabasso a spol. (1958), Burgherová a spol. (1958), Scheitlin a spol. (1959) aj., u nás Jiran (1966).

Larin (1959) hodnotí ve své práci o mechanismu imunity u *HCC* pravděpodobnou úlohu komplement-vázajícího antigenu. Dochází rovněž k závěru, že inaktivovaný virus *HCC*, který si však plně zachoval antigenní účinnost a je aplikován v dostatečném množství a v poměrně čisté formě do organismu dává dobrou imunitu.

Oláh (1958) píše o vývoji inaktivované vakciny proti *HCC* za použití viru z jaterní tkáně infikovaných štěňat. Hodnoty viru *HCC* udává v titrech v reakci vazby komplementu, pro inaktivaci používá 0,05% formalinu a k adsorbci 10 mg/ml gelu hydroxydu hlinitého.

Keeble a spol. (1961) popisují přípravu a vyhodnocování inaktivované vakciny proti *HCC*. Vycházejí z viru z tkáňových kultur psích ledvinových buněk (dále jen TK PSL), inaktivovaného formalinem. Neškodnost ověřují na štěňatech po aplikaci dvou dávek po 1,0 ml vakciny v rozmezí 14 dnů. Pro zkoušku účinnosti testují séra těchto štěňat odebraná za 14 dní po druhé dávce vakciny na obsah neutralizačních protilátek.

Fastier a spol. (1964) srovnávají na morčatech a na štěňatech imunizační vlastnosti vakcín proti *HCC* připravených z viru z TK PSL, inaktivova-

ného formalínem nebo beta-propiolaktonem podané bez nebo s olejovým adjuvanciem. Po jednorázové aplikaci 1,5 ml olejové inaktivované vakciny docílují shodné výsledky imunizace jako po dvou dávkách po 1,0 ml vakciny bez adjuvancia.

Rozbor použití různých očkovacích látek proti *HCC*, ale zejména kombinovaných vakcín proti *HCC* a proti psince uvádí např. Mansi (1961), rovněž Piercy (1965) a v poslední době Ackermann (1965).

Burgherová a spol. (1958), Cabasso a spol. (1958), Piercy a spol. (1960) aj. uvádí dobré imunizační vlastnosti živých kombinovaných vakcín proti psince a proti *HCC*.

Howell (1961), Dräger a spol. (1961), dále pak Keeble a spol. (1961) a Zuschek a spol. (1961) doporučují a popisují inaktivovanou vakcinu proti *HCC* v kombinaci s živou protipsinkovou vakcinou nebo i s jinými antigeny (např. leptospiry).

Na našem pracovišti jsme přikročili k přípravě a vyhodnocování inaktivované vakciny proti *HCC* souběžně s vývojem vakciny živé z modifikovaného viru *HCC*.

V předložené práci chceme uvést některá data získaná při testování několik šarží formol-adsorbátových vakcín proti *HCC*.

MATERIÁL A METODIKA

VIRUS

Používali jsme virus *HCC* kmen „Terezín“ izolovaný na našem pracovišti (Jiran 1964). Pasážujeme jej na TK PSL, na kterých vytváří virus charakteristický cytopatický efekt. Pro naše práce jsme používali medium z těchto kultur odebrané na vrcholu změn. Virus jsme ukládali při teplotách -30°C nebo -45°C .

Jako virulentní virus *HCC* jsme používali zpočátku tento kmen do jeho 21. pasáže na tkáňových kulturách, který od 16. pasáže však nezpůsoboval hynutí štěňat, ale jen různě silné klinické reakce. Později kmen označený „Staněk“, rovněž izolovaný na našem ústavě, který pasážujeme na štěňatech, kde po intraperitoneální aplikaci 20% suspenze jater způsobuje zpravidla jejich úhyn během jednoho týdne.

TKAŇOVÉ KULTURY PSÍCH LEDVINNÝCH BUNĚK (TK PSL)

Pro pomnožení viru *HCC* pro přípravu vakciny, dále pro titraci viru a pro neutralizační testy jsme používali primární TK PSL, někdy však i versenované jednovrstevné kultury ve stacionární kultivaci, jejichž přípravu jsme popsali již dříve (Jiran 1964).

PŘÍPRAVA VAKCÍNY

Vakcinu *HCC* jsme připravovali z viru *HCC* z TK PSL s obsahem nejméně 10^5 TK ID₅₀ viru/ml a s obsahem komplement-vázajícího antigenu v ředění nejméně 1 : 4. Virus jsme centrifugovali 30 minut při 1500–2000 obr./min., přidali formalín do koncentrace 1 : 2000 (tj. obsah 20 mg% formaldehydu, resp. 50 mg% formalínu), pH se pohybovalo kolem 7,1–7,3. Prvá část formalinace probíhala po dobu 48 hodin při 26°C za stálého míchání. Po této době jsme přidali stejné množství obchodního hydroxydu hlinitého (přibližně 2% gel) a dále

jsme směs míchali po dobu 24 hodin při 26 °C. Po této druhé části formalinace a adsorpce se vakcína ukládala na 4 °C, zkoušela na bakteriologickou čistotu a rozplnila do požadovaných objemů.

POKUSNÁ ZVÍŘATA

Jako pokusná zvířata nám sloužila zdravá štěňata ve stáří nad tři měsíce. V terénních ověřovacích akcích jsme imunizovali zdravá štěňata většinou z celých vrhů na jednotlivých chovných stanicích. U vakcinovaných zvířat jsme denně sledovali zdravotní stav, v dlouhodobých pokusech jsme v určitých intervalech odebírali krev pro serologické vyhodnocení. Získaná séra jsme inaktivovali 30 minut při 56 °C a ukládali na -30 °C a vyhodnocovali najednou.

REAKCE VAZBY KOMPLEMENTU (RVK)

Používali jsme kapkovou modifikaci RVK, popsanou již dříve (Jiran 1964). Antigen byl připraven z viru HCC z TK PSL, reakci jsme odečítali při 1,5 MHD komplementu.

NEUTRALIZAČNÍ TEST (NT)

Tento test jsme prováděli v postupném ředění zkoušeného séra se stálou dávkou viru (asi 500 i více TK ID₅₀ viru). Směs obou složek jsme inkubovali 60 minut při pokojové teplotě a aplikovali na zkumavkové kultury psích ledviných buněk (buďto primární nebo versenované TK PSL). Test jsme sledovali po dobu 5–7 dní, kdy jsme reakci hodnotili. Titry sér jsme vypočítali jako ND₅₀ (50% neutralizační dávky) podle Reeda a Muencha (1938).

PROTEKČNÍ TEST (PT)

Tento test jsme prováděli na štěňatech klinicky zdravých, kterým jsme aplikovali zkoušenou vakcínu subkutánně v krajině za lopatkou a za 14–28 dní jsme štěňata spolu s kontaktními kontrolami a kontrolami viru infikovali subkutánně nebo intraperitoneálně virulentním virem HCC. Po infekci jsme sledovali zdravotní stav pokusných štěňat po dobu nejméně 14 dní a denně měřili tělesnou teplotu.

Hodnocení protekčního účinku vakcíny jsme prováděli na základě úhynu nebo klinických reakcí kontrol po infekci virem HCC proti reakci vakcinových zvířat.

VÝSLEDKY

1. TESTOVÁNÍ NEŠKODNOSTI VAKCÍN PROTI HCC

Pro zkoušku neškodnosti různých šarží vakcíny proti HCC jsme používali vždy několik štěňat, kterým jsme aplikovali podkožně několiknásobek uvažované dávky vakcíny (viz tabulka I).

Při hodnocení této zkoušky jsme brali v úvahu tu skutečnost, že virus HCC působí ve větším procentu případů jen inaparentní průběh choroby, takže je dosti problematické prokazovat event. stopy viru na štěňatech. Šlo nám tudíž hlavně o lokální a celkovou reakci na zkoušenou vakcínu a domníváme se, že takový

I. Zkouška neškodnosti formol-adsorbátové vakcíny proti HCC na štěňatech

Vakcína	Dávka	Počet štěňat	Průběh	Hodnocení
1/62	9,0 ml	2	neg.*)	neškodná
	bez**)	2		
1/63	8,0 ml	4	neg.	neškodná
	4,0 ml	4		
	bez	4		
1/64	8,0 ml	2	neg.	neškodná
	bez	1		
3/65	8,0 ml	2	neg.	neškodná
	bez	2		

*) – Během sledování zdravotního stavu štěňat po dobu 14–27 dní nedošlo ke klinickým projevům onemocnění nebo k teplotní reakci.

**) – Ke každé zkoušce neškodnosti byla zastavena štěňata bez aplikace vakcíny jako kontaktní kontroly.

test je nutný a pro uvolnění vakcíny pro terénní použití jej pokládáme za dostačující.

Ani v jednom případě nedošlo u štěňat i po několikanásobné dávce vakcíny k postvakcinační reakci. Nedošlo ani k onemocnění kontaktních kontrol, které zůstaly během styku s vakcinovanými zvířaty beze změn. Po testové infekci kontaktních kontrol (viz zkouška účinnosti vakcíny) reagovaly tyto jako kontroly viru.

Je možno říci, že všechny zkoušené vakcíny připraveny podle výše uvedeného postupu jsou za daného postupu zkoušky neškodné.

Ke zkoušce neškodnosti vakcíny lze připojit rovněž ověření několika šarží za terénních podmínek, kdy u sledovaných vakcinovaných štěňat nedošlo k lokálním afekcím nebo k projevům onemocnění po aplikaci vakcíny.

2. ZKOUŠKA ÚČINNOSTI VAKCÍNY PROTI HCC

Účinnost formol-adsorbátové vakcíny proti HCC se testovala jednak v krátkodobých pokusech za experimentálních podmínek, jednak dlouhodobě za terénních podmínek.

Pro vakcinaci štěňat jsme volili podkožní aplikaci v krajině za lopatkou a to dávkou v prvním pokuse (op. č. 1/62) 3,0 ml. V dalším pokuse jsme si titrační aplikací vakcíny ověřili, že ještě 0,5 ml vakcíny dává vzniku vzestupu protilátek a zaručuje dostačující imunogenní účinek. Proto jsme volili jako dávku pro další vakcinaci 2,0 ml (viz op. č. 1/63, 1/64, 3/65). V tabulce II jsou uvedeny výsledky zkoušky účinnosti PT několika šarží této vakcíny.

II. Zkouška účinnosti formol-adsorbátové vakcíny proti HCC v protekčních testech na štěňatech za experimentálních podmínek

Vakcína	Dávka	Počet štěňat	Průběh infekce virulentním virem		
			klinické reakce	úhyn	hodnocení
1/62	3,0 ml	4	neg.*)	—	účinná
	kontaktní kontroly	2	slabé**)	—	
	kontroly viru	2	slabé	—	
1/63	0,5 ml	2	neg.	—	účinná v 0,5 ml***)
	1,0 ml	4	neg.	—	
	2,0 ml	4	neg.	—	
	4,0 ml	4	neg.	—	
	kontaktní kontroly	4	slabé	—	
	kontroly viru	2	slabé	—	
1/64	2,0 ml	2	neg.	—	účinná
	kontaktní kontroly	1	slabé	—	
	kontroly viru	2	slabé	—	
3/65	2,0 ml	4	neg.	—	účinná
	kontaktní kontroly	2	silné	1	
	kontroly viru	2	silné	2	

*) — Po infekci virulentním virem se nedostavily klinické příznaky onemocnění, ani teplotní reakce

**) — Po infekci virulentním virem se dostavily jen slabé klinické příznaky onemocnění, které se daly vztahovat na testovou infekci

***) — Účinnost byla potvrzena rovněž serologickým vyšetřením, kde byla prokázána tvorba a vzestup protilátek i po dávce 0,5 ml vakcíny.

Hodnocení krátkodobé zkoušky účinnosti PT naráželo často na potíže proto, že na virulentní virus HCC nereagovala kontrolní štěňata vždy promptní klinickou reakcí nebo úhynem. Teprve v posledních pokusech (např. op. č. 3/65) došlo k výraznému a jednoznačnému výsledku při testování vakcíny, kdy po aplikaci virulentního viru obě kontroly viru uhynuly během 6 dní p. i. a z dvou kontaktních kontrol uhynula jedna a druhá měla typické klinické příznaky s vý-

III. Titry neutralizačních protilátek vakcinovaných psů v G. (Vakcína proti HCC 1/64, PS-útvár Děčín)

Doba odběru krve	Titry neutralizačních protilátek										Nebylo testováno	
	do 20		20—100		100—300		300—600		nad 600			
	počet psů	%*)	počet psů	%	počet psů	%	počet psů	%	počet psů	%	počet psů	%
Před vakcinací	24	82,8	5	17,2	—	—	—	—	—	—	—	—
14 dní po vakcinaci	2	6,9	18	62,0	8	27,6	—	—	—	—	1	3,4
1 měsíc po vakcinaci	—	—	11	37,9	10	34,4	4	13,7	4	13,7	—	—
2 měsíce po vakcinaci	—	—	13	44,8	7	24,1	5	17,2	4	13,7	—	—
3 měsíce po vakcinaci	—	—	15	51,7	1	3,4	3	10,3	1	3,4	9	31,0
6 měsíců po vakcinaci	—	—	6	20,6	4	13,7	1	3,4	1	3,4	17	58,6

*) – Hodnocení v procentech se vztahuje na celkový počet 29 imunizovaných zvířat.

IV. Hladiny neutralizačních protilátek psů bez a s obsahem protilátek v době vakcinace v G. (Vakcína proti HCC 1/64, PS-útvár Děčín)

Skupina štěňat	Titry	Doba odběru vzorků krve před a po vakcinaci					
		0	14 dní	1 měsíc	2 měsíce	3 měsíce	6 měsíců ***)
Bez protilátek*)	minimální–maximální	do 20	20–320	40–320	40–545	40–100	46–465
	průměrné	do 20	61,9	151,4	196,3	50,45	
S protilátkami**)	minimální–maximální	20–80	375–640	375–1613	405–1502	100–640	204,2
	průměrné	57,12	515,34	1130,2	745,0	377,64	

*) – Sledováno celkem 24 štěňat

**) – Sledováno celkem 5 štěňat

***) – Odběry krve bylo možno získat jen z 12 vakcinovaných psů bez možnosti jejich zařazení do skupin.

Titry sér jsou vyjádřeny v reciprokých hodnotách ND₅₀.

razným vzestupem teploty (40,2 °C). Vakcinovaná štěňata však ani v jednom případě neprojevovala příznaky onemocnění HCC.

Při terenním ověřování vakcíny jsme vycházeli z té skutečnosti, že HCC je

u nás endemickou infekční chorobou s tak častým inaparentním průběhem, že ztěžuje lze nalézt chovnou stanici psů, kde by byla záruka, že se tam HCC nevyskytovala či event. i nevyskytuje. Rovněž i při hodnocení všech terénních ověřovacích pokusů musíme tuto skutečnost brát na zřetel.

Ověření vakcíny 1/62 v H. u Prahy bylo značně ovlivněno stálým výskytem HCC v chovné stanici a z 36 vakcinovaných štěňat klinicky zdravých mělo 26 pozitivní titry v RVK na HCC od 1:10—1:20 v den vakcinace (tj. 72,5 % štěňat). Proto jsme celý pokus serologicky podrobně nesledovali a hodnotili jsme jej velmi opatrně.

Vakcínu označenou jako 1/63 jsme ověřovali v P. u Lovosic. Třebaže jsme vakcinovali větší počet štěňat, mohli jsme do hodnocení pokusu vzít pouze 15 štěňat, z nichž ani jedno nemělo v době vakcinace protilátky proti HCC. U všech vakcinovaných štěňat jsme prokázali tvorbu a vzestup neutralizačních protilátek a dynamiku tvorby protilátek jsme sledovali podrobněji na osmi štěňatech, a to u tří štěňat po aplikaci 4,0 ml vakcíny, u pěti štěňat po aplikaci 2,0 ml vakcíny podkožně.

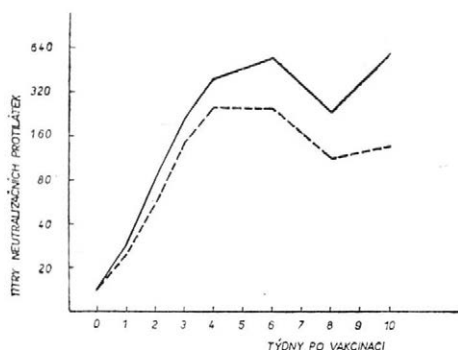
Jak je vidět z grafu 1 objevovaly se neutralizační protilátky za 1–2 týdny, měly po další 2–3 týdny vzestupnou tendenci a dosahovaly svůj vrchol od 4.–6. týdne po vakcinaci. Po této době nastává postupný pokles jejich hladiny.

Vzestup protilátek v období, kdy již docházelo k jejich sestupné tendenci, si vysvětlujeme možným stykem zvířat s virem HCC, který působil jako přirozený antigenní účinn.

Poněkud výraznější protilátkovou odezvu po aplikaci 2,0 ml vakcíny než po 4,0 ml přičítáme mimo jiné zejména různě individuální reakci jednotlivých štěňat, nehledě k tomu, že jde o poměrně malý počet vyšetřovaných vzorků.

Vakcínu 1/64 jsme sledovali na 29 štěňatech v G. (PS útvar Děčín) po dobu 6 měsíců. Pět štěňat z 29 vakcinovaných mělo v době vakcinace neutralizační protilátky (tj. 17,2 %). Protilátková odezva štěňat je znázorněna v tabulce III.

V tabulce IV jsou hodnocena zvláště štěňata bez protilátek v době vakcinace a skupina štěňat, která v době vakcinace protilátky vykazovala.

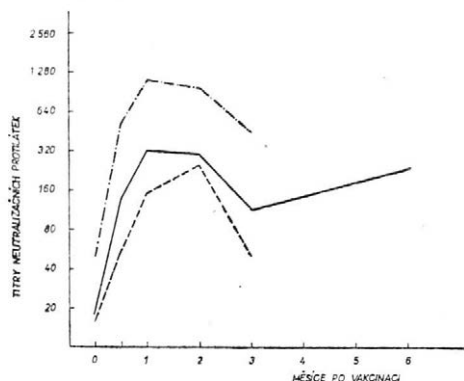


1. Dynamika tvorby neutralizačních protilátek u psů po aplikaci formol-adsorbátové vakcíny proti HCC

(Vakcína 1/63, P. u L.)

———— = Aplikace 2,0 ml vakcíny, průměrné hodnoty ND₅₀ sér 5 psů

----- = Aplikace 4,0 ml vakcíny, průměrné hodnoty ND₅₀ sér 3 psů



2. Dynamika tvorby neutralizačních protilátek u psů po aplikaci formol-adsorbátové vakcíny proti HCC

(Vakcína 1/64, G.)

— · — · — = Průměrné hodnoty ND₅₀ sér psů bez protilátek v době vakcinace

----- = Průměrné hodnoty ND₅₀ sér psů s protilátkami v době vakcinace

———— = Průměrné hodnoty ND₅₀ sér všech vakcinovaných psů

V grafu 2 jsou znázorněny průměrné titry neutralizačních protilátek všech vakcinovaných štěňat a dále rovněž obou skupin štěňat, kde část měla a druhá část neměla v době vakcinace protilátky. V období za 3–6 měsíců po vakcinaci nebylo však z technických důvodů již možno samostatně sledovat jednotlivé skupiny štěňat.

Za 14 dní po vakcinaci je možno pozorovat vzestup protilátek u většiny vakcinovaných štěňat. Vrchol dosahují během 4–8 týdnů a po této době dochází k jejich postupnému poklesu. Vzestup hladiny protilátek je poměrně vyšší u štěňat, která již měla v době vakcinace protilátky a rovněž jejich pokles je u této skupiny štěňat pozvolnější.

Ještě za 6 měsíců po vakcinaci jsme u všech testovaných štěňat prokazovali protilátky v různé výši, avšak jejich výskyt není možno jednoznačně přičíst na úkor vakcinace a jejich nález hodnotíme proto velmi opatrně. I zde si vysvětlujeme vzestup protilátek u některých zvířat, která již vykazovala pokles v hodnotách protilátek (zejména z odběru krve za 6 měsíců po vakcinaci) možným stykem štěňat s virem HCC, který mohl působit jako přirozený antigenní impuls.

DISKUSE

Třebaže dochází ve světě k různým názorům na vlastní koncepci aktivní imunizace proti HCC, jsou popsány úspěšné vakcinační akce jak s živými vakcinami (Piercy a spol., 1960, Cabasso a spol., 1958, Burgherová a spol., 1958, aj.), tak rovněž s inaktivovanými vakcinami (např. Howell, 1961, Dräger a spol., 1961, Keeble a spol. 1961, Zuscheck a spol., 1961, Ackermann 1965 aj.).

V naší práci jsme sledovali imunizační efekt inaktivované formol-adsorbátové vakciny proti HCC jak za experimentálních, tak za terénních podmínek.

Pro přípravu vakciny jsme používali vlastní modifikovaný výrobní postup, kde jsme vycházeli stejně jako např. Keeble a spol. (1961) nebo Zuscheck a spol. (1961) z viru HCC z TK PSL, který jsme inaktivovali formalínem. Pro zvýšení antigenního impulsu vakciny jsme však podobně jako Oláh (1958) použili gel hydroxydu hlinitého.

Formol-adsorbátová vakcína proti HCC je neškodná, ani čtyřnásobek uvažované dávky vakciny nevyvolá nežádoucí postvakcinační reakce.

Hodnocení krátkodobé účinnosti protekčními testy naráželo sice mnohdy na problém, že kontrolní štěňata nereagují promptně na aplikaci virulentního viru úhynem a často dochází jen k nevýrazným klinickým projevům onemocnění. Z tohoto hlediska by tato otázka vyžadovala izolaci takového virulentního viru HCC, který by způsoboval pravidelně úhyn infikovaných štěňat.

Terénní pokusy všeobecně jsou zatíženy tou skutečností, že v chovech se často vyskytuje inaparentní průběh HCC, který může zkreslovat účinek vakcinace. V našich ověřovacích pokusech např. docházelo ke vzestupu protilátek u štěňat v období, kdy protilátky měly již klesající trend, což si vysvětlujeme přirozeným antigenním nárazem. Nemáme však za to, že vzestup hladiny protilátek po vakcinaci lze přičíst přirozenému antigennímu impulsu. Již proto, že tento vzestup nastává u všech vakcinovaných štěňat souběžně a nezávisle ve více stanicích a po aplikaci různých šarží vakciny. Nehledě k dosaženým výsledkům protekčními testy za experimentálních podmínek. Rovněž je např. patrný vliv antigenního účinku vakciny aplikované štěňatům, která již měla neutralizační protilátky v době vakcinace.

Vcelku můžeme na základě našich pozorování říci, že imunogenní vlastností inaktivované vakciny proti HCC jsou dobré, vakcína dává vzniku imunity s tvorbou neutralizačních protilátek, které přetrvávají v menších kvantech po dobu několika měsíců.

Dávka vakciny 2,0 ml podkožně se nám jeví jako vhodná a dává dostatečnou imunogenní odezvu.

Neřešili jsme otázku revakcinace, kterou např. Keeble a spol. (1961) u vakciny bez adjuvancia zahrnují do vakcinačního schematu. Domníváme se však, že revakcinace popsanou vakcinou je nutná pro dosažení hlubší a déletrvající imunity. Pokládáme revakcinaci za vhodnou v období za 6–10 týdnů po vakcinaci, kdy neutralizační protilátky u všech štěňat mají sestupný trend.

Z několika pozorování je patrné, že se u některých vakcinovaných psů v období poklesu jejich hladiny protilátek dostavuje určitý vzestup. Předpokládáme, že tu jde o možnost přirozeného antigenního impulsu při styku vakcinovaného štěněte s virem HCC. Domníváme se, že by podobný účinek vyvolala revakcinace provedená v době klesající tendence hladiny protilátek vakcinovaných štěňat. Revakcinace by tu působila patrně jako vakcinace štěňat, která již protilátky vykazují.

ZÁVĚR

Je popsáno ověření neškodnosti a účinnosti formol-adsorbátové vakciny proti HCC za experimentálních a terénních podmínek. Vakcína připravená z viru HCC kultivovaného na tkáňových kulturách psích ledvinových buněk je neškodná, je účinná v krátkodobých zkouškách protekčními testy. V terénním ověření vakciny byla sledována dynamika tvorby protilátek, které mají během 4–8 týdnů vzestupnou tendenci, potom dochází k jejich pozvolnému poklesu.

Je diskutováno o revakcinaci.

Došlo dne 9. 4. 1966

Technická spolupráce: Marie Krámerová a Ivana Štrosová.

Literatura

1. ACKERMANN, O.: Vergleichende tierexperimentelle Untersuchungen von Vaccinen gegen Staupe und Hepatitis contagiosa canis. = „Blauen Hefte“ 30 : 5-14, 1965. — 2. BURGER, J. A. - BAKER, J. A. - SARKAR, S. - MARSHALL, V. - GILLESPIE, J. H.: Evaluation of a combined vaccine consisting of modified canine distemper virus and modified infectious canine hepatitis virus for simultaneous immunization of dogs. = „Cornell Vet.“ 48 : 214-223, 1958. — 3. CABASSO, J. V. - STEBBINS, M. R. - AVAMPATO, J. M.: A bivalent live virus vaccine against canine distemper (CD) and infectious canine hepatitis (ICH). = „P. S. E. B. & M.“ 99 : 46-51, 1958. — 4. DRAEGER, F. - ACKERMANN, O.: Über die Anwendung von kombinierten Vaccinen gegen Staupe und Hepatitis contagiosa canis. = „Blauen Hefte“ 2 : 444-449, 1961. — 5. EMERY, J. B. - YORK, C. J.: Propagation of infectious canine hepatitis virus in porcine tissue culture. = „Science“ 127 : 143, 1958. — 6. FASTIER, L. B. - HANSEN, M. F.: An adjuvant vaccine against infectious canine hepatitis. = „New Zealand Vet. J.“ 12 : 89-91, 1964. — 7. FIELDSTEEL, H. A. - YOSHIWARA, G. M.: Propagation of infectious canine hepatitis virus in culture of pig and ferret kidney. = „P-S-E. B. a. M.“ 95 : 683-686, 1957. — 8. HOWELL, D. G.: Vaccination of the dog. = „Vet. Rec.“ 73 : 46-54, 1961. — 9. JIRAN, E.: Infekční zánět jater psů (Rubarth). Isolate a kultivace viru. = „Vet. Med.“ 9 : 267-272, 1964. — 10. JIRAN, E.: K atenuaci viru infekční hepatitidy psů. = „Vet. Med.“ 11 : 215-223, 1966. — 11. KEEBLE, S. A. - BAKER, L. A. - HOWELL, D. G.: Immunization against virus hepatitis using an inactivated vaccine. = „Vet. Rec.“ 73 : 286-289, 1961. — 12. KEEBLE, S. A. - HEATH, K. S. - BAKER, L. A.: Simultaneous vaccination against distemper, hepatitis and leptospirosis. = „Vet. Rec.“ 73 : 726, 1961. — 13. LARIN, M. N.: The mechanism of immunity in canine virus hepatitis. = „Brit. Vet. J.“ 115 : 34-45, 1959. — 14. MANSI, W.: Dual vaccination of dogs against canine distemper complex and canine virus hepatitis. = „J. Comp. Path.“ 66 : 136-144, 1956. — 15. MANSI, W.: Protection against canine virus diseases in Great Britain. = „Vet. Rev.“ 73 : 1102-1111, 1961. — 16.

OLÁH, P.: Experiments for the production of immune serum and vaccine against infectious hepatitis of the dog (Rubarth's disease). = „Acta Vet. Acad. Sci. Hung.“ 8:409-423, 1958. J 17. PIERCY, S. E. - SELLERS R. F.: Antibody response to a combined living attenuated distemper/hepatitis vaccine. = „Res. Vet. Sci.“, 1:84-93, 1960. — 18. PIERCY, S. E.: Problems of the manufacture and use of vaccine for canine and feline viral diseases. = „Tijdschrift voor Diergeneskde“ 90:557-575, 1965. — 19. POPPENSIECK, G. C. - BAKER, S. A.: cit podle 2. — 20. REED, L. J. - MUENCH, H.: A simple method of estimating fifty per cent endpoint. = „Am. J. Hyg.“ 27:493-497, 1938. — 21. SCHEITLIN, M. - SUTER, P.: Praktische Versuche mit CYVAC, einem neuen kombinierten Impfstoff gegen Hepatitis contagiosa canis und Hundestaupe. = „Schw. Arch. f. Tierhke.“ 101:225-234, 1959. — 22. ZUSCHEK, F. - JUNGK, N. - KING, D. - SWANGARD, W. M.: Noninterference with immunity by a trivalent vaccine containing distemper virus, infectious canine hepatitis virus and leptospira canicola. = „Cornel. Vet.“ 51:68-76, 1961.

Проверка иммунизационных свойств инактивированной вакцины против инфекционного гепатита собак

В статье описывается проверка безвредности и эффективности формол-адсорбатной вакцины против HCC при экспериментальных и производственных условиях. Вакцина, приготовленная из вируса HCC, культивированного на тканевых культурах собачьих почечных клеток, безвредна и эффективна в краткосрочных испытаниях с помощью защитных тестов. В производственной проверке вакцины изучалась динамика образования антител, которые в течение 4—8 недель имеют восходящую тенденцию, затем происходит их постепенное понижение.

Обсуждается вопрос повторной вакцинации.

Checking of the Immunization Properties of Inactivated Vaccine Against Infectious Hepatitis of Dogs

There is a description of the checking of the harmlessness and effectiveness of a formal-adsorbate vaccine against HCC under experimental and field conditions. The vaccine prepared from the HCC virus cultivated on tissue cultures of dog kidney cells is harmless, and it is effective in short-term protective tests. The field checking of the vaccine examined the dynamics of the antibody formation, which have an ascending tendency for 4—8 weeks, after which their gradual decreasing sets in.

Revaccination is being discussed.

Die Überprüfung der Immunisationseigenschaften der inaktivierten Vakzine gegen infektiöse Hepatitis der Hunde

Die Überprüfung der Unschädlichkeit und Wirksamkeit der Formaldehyd-Ad-sorbat-Vakzine gegen HCC bei experimentellen und Geländebedingungen wird beschrieben. Die Vakzine, die aus dem auf Gewebekulturen von Hunde-Nierenzellen kultivierten Virus HCC zubereitet wurde, ist unschädlich; sie ist in den kurzfristigen Prüfungen mittels der Protektionsteste wirksam. Bei der Überprüfung der Vakzine im Gelände wurde die Dynamik der Bildung von Antikörpern verfolgt, die während 4—8 Wochen eine steigende Tendenz aufweisen; sodann tritt eine langsame Herabsetzung ihrer Anzahl ein. Es wird die Revakzination diskutiert.

Adresy autorů:

MVDr. Eduard Jiran, CSc., Bioveta, n, p, Terezín, ředitel MVDr. R. Dombek MVDr. Božetěch Juračka, MVDr. Milan Tokár, PS - útvar Pohraniční stráže — Děčín

**VLIV TEPLoty
NA HEMAGLUTINAČNÍ AKTIVITU
A INFEKCIOSITU NĚKTERÝCH KMENŮ
VIRU NEWCASTLESKÉ NEMOCI**

**II. ZMĚNY HEMAGLUTINABILITY A INFEKCIOSITY VIRU
BEHEM SKLADOVÁNÍ PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH**

■ Stálost viru pseudomoru drůbeže (NDV) kolísá během skladování pod vlivem prostředí v poměrně širokém rozmezí (Rhoades 1958, Hofstad a Yoder 1963) a možnost skladování živých i inaktivovaných vakcín je v přímém vztahu k termostabilitě viru (Pickens 1964). Údaje o termostabilitě mají tedy praktický význam pro kombinaci lyofilizace a nízkých teplot při uchovávání viru na různě dlouhá období i pro sledování účinku chemických inaktivačních prostředků za různých teplot. Stabilita infekčních vlastností za přirozených podmínek — v podestýlce, půdě, kurnících — je důležitá pro likvidaci nákazy a prevenci reinfekce terénu. Kromě bezprostředně praktického významu rozšiřuje studium termostability viru poznatky o jeho fyzikálně chemických vlastnostech.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Literární údaje o stabilitě infekční a hemaglutinační složky viru během skladování při různých teplotách se liší podle způsobu uchovávání i podle typu vyšetřovaného kmene. Farinas (1930) dokázal, že NDV se inaktivuje při 37 °C během 72 hod. Olesiuks (1951) zjistil, že životnost NDV se podstatně snižuje při teplotách 20 °C a vyšších s prudkým poklesem při 37 °C. Podle Torlone (1955) dojde k velmi malým ztrátám hemaglutinační aktivity (HA) při skladování kmene F v alantoamniotických tekutinách (AAT) za 120 hod. při 25 °C, za 48 hod. při 37 °C nebo za 60 dní při +4 °C. Také Lancaster (1957) pozoroval, že tento kmen v AAT si uchovává imunizační hodnotu po nejméně 6 měsících při +4 až +6 °C. Lyofilizovaná vakcína z kmene F vykazuje při 37 °C pokles HA aktivity už po 25 dnech a dále po 55 a 75 dnech, pokles imunogenity po 35 dnech s úplným vymizením po 45 dnech (Lancaster 1962).

Podle Gordona et al. (1948) si uchoval virus v kůži jatečné drůbeže infekční schopnost nejméně 60 dní při skladování při -4,5 až +2 °C. Asplin (1949) našel virus po 98 dnech v kůži a po 134 dnech v kostní dřeni drůbeže, uměle infikované, oškubané, vyvrhnuté a skladované při +1,5 °C a po 160 dnech při -20 °C. Virus na vaječné skořápce, filtračním papíru a ve sterilizovaném trusu byl aktivní po 72 hod. při 36,5 °C, ale do 12 dní byl inaktivován. Podobné výsledky uvádí Michalov (1959), který izoloval živý virus ze vzorků mražené drůbeže, skladované při -10 až -12 °C po 90 dnech, z kůže drůbeže skladované při -12 až -14 °C 150. den a z masa, uskladněného při -14 až -20 °C ještě 250. den.

Podle shrnutí Š k o d y a Ž u f f y (1961) je virus, suspendovaný v AAT, inaktivován při teplotě kolem 40 °C za 15 dní, při 25 až 30 °C za 30 dní a při 1–12 °C vydrží i více než 28 měsíců. Při teplotách kolem 0 °C a nižších vydrží podle povahy materiálu i léta.

Úkolem této práce bylo sledovat inaktivační vliv teploty +37°, +4° a –15 až –20 °C na hemaglutinující (HA) a infekční složku některých kmenů NDV s rozličnou virulencí.

M A T E R I Á L A M E T O D I K A

K pokusům jsme použili tři kmeny lentogenní: B 1 (Hitchner), La Sota a F (Asplin), čtyři mezogenní: Roakin (R), Lederle (L), Hertfordshire (H) a Komarov (K) a 2 kmeny virulentní: 2455/6 a 366/4. U kmene Roakin byla vyšetřena jeho 21. a 50. sériová pasáž na kulturách kuřecích embryonálních buněk — R/TK₂₁ a R/TK₅₀. Všechny kmeny byly uchovány v lyofilizovaném stavu.

Virus pro pokusné účely jsme získali infekcí 10denních kuřecích embryí (KE) ředěním 10⁻³ při lentogenních a mezogenních — ředěním 10⁻⁵ při velogenních kmenech dávkou 0,2 ml do alantoidní dutiny. KE, infikovaná velogenními a mezogenními kmeny, byla inkubována při 37 °C 48 hod., lentogenními kmeny 72 hod. Směs infekčních AAT z 10–12 KE jsme ředili, jak bylo popsáno v prvním sdělení této série (Č e r n í k 1966), fyziologickým roztokem s veronalovým nárazníkem o pH 7,0–7,1 v poměru 1 : 10 a rozplnili po 3 ml do 14 zkumavek, zazátkovaných korkovými zátkami.

4 zkumavky, označené T₁ až T₄, byly uloženy do termostatu při 37 °C (±0,5 °C) a 4 zkumavky, označené Ch₁ až Ch₃, při chladničkové teplotě ca +4 °C. 6 kontrolních bylo uchováváno ve zmraženém stavu při –15 až –20 °C.

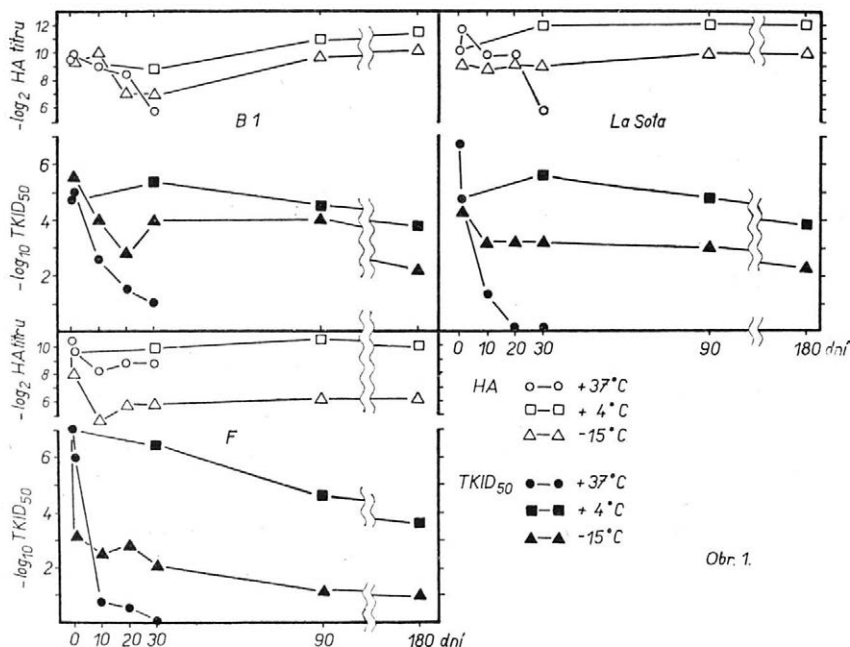
Vzorky byly odebírány a jejich HA aktivita a infekčnost vyšetřována způsobem, popsaným v prvním sdělení, podle tohoto časového rozvrhu: Vzorky T₁–T₄ za 24 hod., 10, 20 a 30 dní, vzorky Ch₁–Ch₃ za 1, 3 a 6 měsíců. Každý vyšetřovaný vzorek byl porovnáván s kontrolním zmraženým vzorkem. Před vyšetřením byly vzorky ponechány při laboratorní teplotě až do vyrovnání teplot. První kontrolní vzorek byl vyšetřen hned po odběru a naředění.

U každého kmene jsme vyšetření třikrát až čtyřikrát opakovali. Zjištěné průměrné hodnoty jsme vynášeli do grafu a sestrojili křivky poklesu HA aktivity a infekčnosti.

V Ý S L E D K Y P O K U S Ů

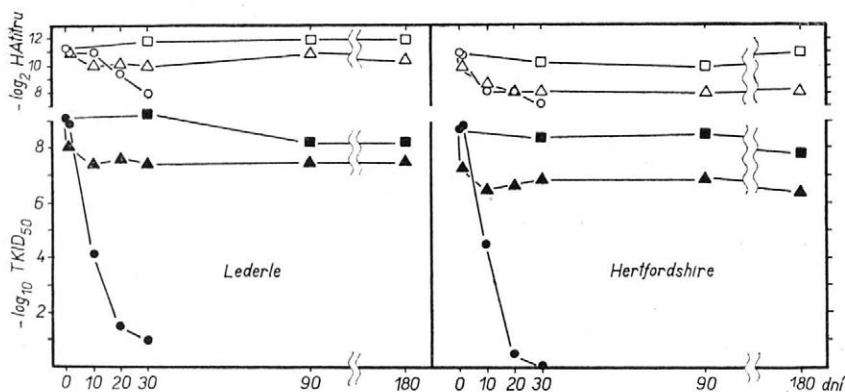
TEPLOTA 37 °C

Infekčnost lentogenních a mezogenních kmenů zaznamenává při teplotě 37 °C prudký a výrazný pokles hlavně během prvních 10 dní skladování, kdy dojde ke snížení titru TKID₅₀ o 2,2 až 6,6 log. jednotek (gr. 1–3). Pokles byl relativně nejvýraznější u lentogenních kmenů F a La Sota o 6,2 resp. 5,4 log. jednotek (gr. 1) a obou tkáňových linií kmene R: R/TK₂₁ o 6,6 a R/TK₅₀ o 5,5 log. jednotek (gr. 2). Střední skupinu tvoří všechny mezogenní kmeny (gr. 2 a 3), u nichž poklesla v této době infekčnost o 3,7 (kmen R) až 5,0 log. jednotek (kmen K — gr. 3b.). Nejmní pokles pozorován u kmene B 1 — o 2,2, log. jednotek. Během dalších 10 dní se pokles zmírňuje a křivka dosahuje nejnižších



Obr. 1.

Gr. 1. — Inaktivační křivky hemaglutinační aktivity a infekčnosti lentogenních kmenů při teplotě + 37°, + 4° a - 15 °C.

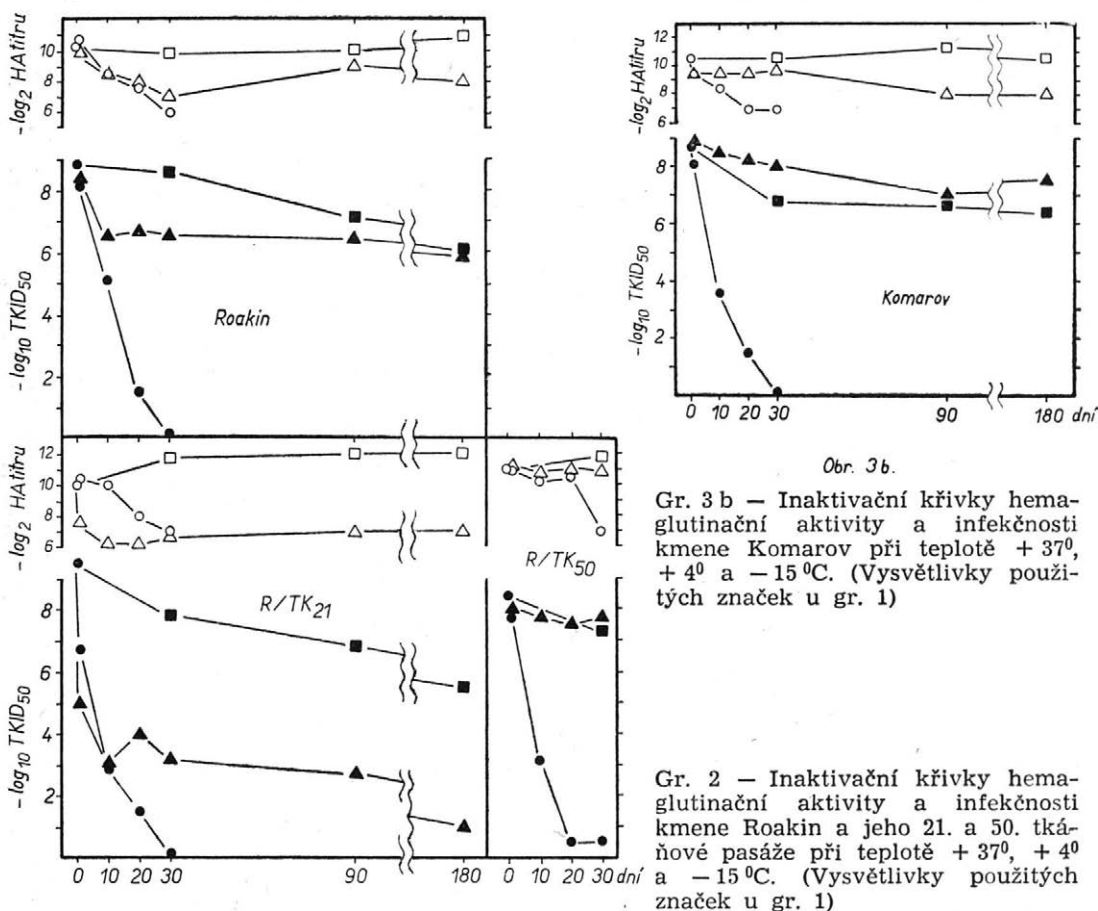


Obr. 3a.

Gr. 3a — Inaktivační křivky hemaglutinační aktivity a infekčnosti mezogenních kmenů Lederle a Hertfordshire při teplotě + 37°, + 4° a - 15 °C. (Vysvětlivky použitých značek na gr. 1)

hodnot mezi 20. a 30. dnem skladování, přičemž u některých kmenů — B 1, R a L — zůstává i po 30 dnech v suspenzi malé, ale zjistitelné množství živého viru, do 10^1 TKID₅₀/0,1 ml.

Oba velogenní kmene se sice liší od sebe poklesem infekčnosti v prvních 10 dnech (gr. 4), u virulentnějšího kmene 366/4 je hlubší (průměrně o 5,9 log. jednotek) než u kmene 2455/6 (průměrně o 4,6 log. jednotek), ale po 20 dnech

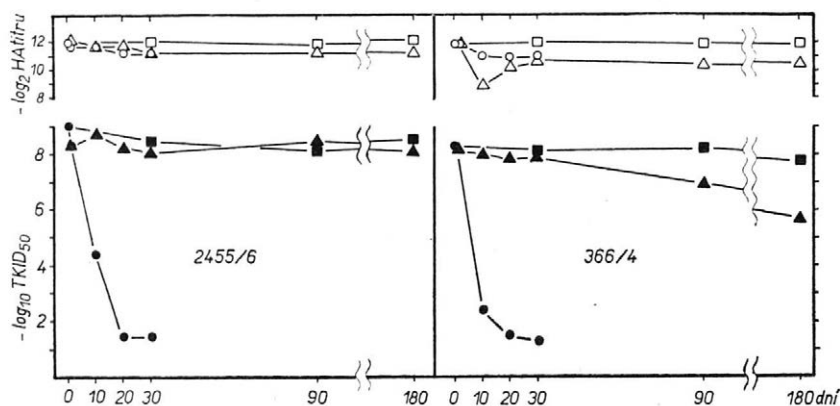


se hodnoty prakticky vyrovnají. Po 30 dnech skladování zůstává titr TKID₅₀ vyšší než 10⁻¹.

Poněkud odlišný obraz poskytují křivky HA aktivity jednotlivých kmenů. Po 24 hod. dochází buď k mírnému poklesu nebo mírnému zvýšení v rozsahu zhruba 1 stupně ředění. Během prvních 10 dní klesá HA aktivita u části kmenů (B 1, La Sota, tkáňové pasáže R a L) o necelý stupeň ředění proti výchozí hodnotě, u druhé části kmenů se sníženou virulencí o 2–3 stupně ředění. V časovém rozmezí 10 až 20 dní byl zaznamenán výraznější pokles — do 2 stupňů ředění — u kmenů L, K a R/TK₂₁. V poslední fázi, mezi 20 a 30 dny, je pokles velmi výrazný u kmenů B 1, La Sota, R, R/TK₅₀ a L. U ostatních nepřesahuje 1 ředění. U kmenů se sníženou virulencí zůstává ve všech případech i po 30 dnech zachována zbytková HA schopnost v titru 1:40–1:160 a ve třech případech (F, L a H) více než 1:160.

U velogenních kmenů nedosahuje pokles HA aktivity 1 stupně ředění během 30 dní, přičemž, podobně jako u infekčnosti, byl zjištěn u kmene 366/4 prudší pokles v prvních 10 dnech. HA titry neklesly v průměru pod ředění 1:2560.

Teplota 37 °C inaktivuje tedy výrazně infekční složku všech vyšetřovaných kmenů NDV, a to hlavně během prvních 10 až 20 dní, zatímco u některých



Obr 4

Gr. 4 — Inaktivační křivky hemaglutinační aktivity a infekčnosti velogenních kmenů NDV při teplotě $+37^{\circ}$, $+4^{\circ}$ a -15°C .
(Vysvětlivky použitých značek na gr. 1)

kmenů se uchovávala malé, ale zjiitelné množství reprodukce schopného viru i po 30 dnech tepelné inaktivace. Naproti tomu HA schopnost viru po počáteční mírné aktivaci klesá u vakcinačních kmenů nepravidelně během celého období a po 30 dnech vykazuje ještě dost vysoké titry, u virulentních kmenů je během 30 dní narušena jen nepatrně.

TEPLOTA $+4^{\circ}\text{C}$

Skladování při chladničkové teplotě narušuje jen mírně infekčnost vyšetřovaných kmenů NDV. Inaktivační křivka klesá zvolna, ale stále během celého sledovaného období, ve všech případech však zůstává na hodnotách vyšších než křivka infekčnosti viru uchovávaného ve zmraženém stavu. Tento rozdíl je zvláště výrazný u lentogenních kmenů a R/TK₂₁. Výjimkou jsou kmeny K, kde je poměr obrácený, R/TK₅₀ a 2455/6, kde se obě křivky prakticky kryjí.

Během 6 měsíců dochází u lentogenních kmenů k poklesu infekčnosti o 1–3,4 log. jednotky s konečnými hodnotami $10^{3.5}$ až $10^{4.0}$ TKID₅₀/0,1 ml, u mezogenních kmenů o 1–2,8 log. jednotky na hodnoty $10^{6.0}$ až $10^{7.5}$ TKID₅₀/0,1 ml a u velogenních kmenů o 0,5 log. jednotky na $10^{8.5}$ resp. $10^{7.75}$ TKID₅₀/0,1 ml. Kmen R/TK₂₁ se poklesem infekčnosti o 4,0 log. jednotky řadí spíše k lentogenním kmenům.

HA aktivita vyšetřovaných kmenů NDV nebyla narušena skladováním při $+4^{\circ}\text{C}$ v žádném případě. V několika případech byl dokonce zaznamenán vzestup průměrných hodnot v prvním měsíci nebo mezi 1. a 6. měsícem, takže po 6 měsících byly zjištěny vyšší průměrné hodnoty HA titru o 1–2 stupně ředění u kmenů B 1, La Sota, L, R a jeho tkáňových pasáží.

TEPLOTA -15 AŽ -20°C

U všech vakcinačních kmenů je zaznamenán po zmrazení tj. po 24 hod. a po 10 dnech skladování více méně prudký pokles infekčnosti v rozsahu 1–4,5 log jednotek. Výjimkou je kmen K s trvalým pozvolným poklesem infekčnosti po

přímce a R/TK₅₀, u něhož nepřekročil pokles během 30 dní 1 log. jednotku. Po 10. dni dochází všeobecně k vyrovnání inaktivační křivky, s lehce sestupnou tendencí u kmene F a K. Další mírný pokles byl pak pozorován u většiny kmenů v období mezi 3. a 6. měsícem. Jen kmen R/TK₂₁ vykázal v tomto období silnější pokles — o více než 2 log. jednotky.

U kmene 2455/6 došlo v prvním měsíci k poklesu, nedosahujícímu 1 log. jednotku a během dalších 5 měsíců se infekční titr udržel na stálé úrovni. Naproti tomu kmen 366/4 ztratil jen malou část své infekčnosti v 1. měsíci, ale pokles byl stálý, takže po 3 měsících se jeho infekční titr snížil o více než 1 log. jednotku a o stejný stupeň během dalších 3 měsíců.

Po 6 měsících zůstává u lentogenních kmenů zachován poměrně nízký titr $10^1 - 10^{2,2}$ TKID₅₀/0,1 ml a podobně je tomu u R/TK₂₁. Mezogenní kmeny si i po půlročním skladování při -15 až -20 °C uchovávají titr $10^{5,8}$ až $10^{7,5}$ TKID₅₀. Virulentní kmen 2455/6 má ještě po 6 měsících titr $10^{8,2}$ proti výchozímu $10^{9,0}$ TKID₅₀, kmen 366/4 však jen $10^{5,7}$ proti $10^{8,3}$ TKID₅₀/01 ml.

HA aktivita lentogenních kmenů skladovaných při -15 až -20 °C klesá v prvním období 10–20 dní o 1–5 stupňů ředění, ale v dalším období byl zaznamenán opět vzestup. U kmene B 1, u něhož byl pokles opožděn o jeden časový úsek, došlo dokonce k zvýšení o málo nad výchozí hodnoty HA titru. Podobně jako lentogenní kmeny se chovala i linie R/TK₂₁. U mezogenních kmenů byl pokles pozvolný během prvních 30 dní, o 1–3 stupně ředění, pak došlo ke zvýšení HA titru a vyrovnání, nebo jen k vyrovnání (kmen H). U kmene K došlo k poklesu hemaglutinability o $1\frac{1}{2}$ stupně v období mezi 1. a 3. měsícem s následným setrváním na stejné úrovni. Podobně se chovala i linie R/TK₅₀ během sledovaného období 30 dní. Také u velogenních kmenů klesal HA titr v prvním měsíci; v následujícím období došlo k vyrovnání inaktivační křivky u kmene 2455/6 a zvýšení a vyrovnání u kmene 366/4. Po 6 měsících skladování pokles HA titru v prvním případě nedosáhl, ve druhém mírně překročil 1 stupeň ředění.

HA titry lentogenních a mezogenních kmenů NDV se pohybují po 6 měsících skladování při -15 až -20 °C mezi 1 : 80 až 1 : 1280 bez rozdílů virulence viru. Velogenní kmeny si uchovaly v průměru titry 1 : 2560 resp. 1 : 1280. U kmene F, R/TK₂₁ a 366/4 jsou po 1 měsíci nižší HA titry při skladování ve zmraženém stavu než při teplotě $+37$ °C a u kmene 2455/6 dosahují stejných hodnot.

DISKUSE

Zatímco teploty kolem 56 °C narušují rychleji HA složku NDV (Černík 1966), teploty do 37 °C naopak inaktivují dříve jeho složkou infekční. Inaktivace virů působením teplot kolem 56 °C a kolem 37 °C je tedy zřejmě vyvolávána rozličnými mechanismy. Svědčí o tom i pozorování Youngnera (1957), že na rozdíl od teploty 50 °C nelze selektovat varianty polioviru rezistentní vůči teplotě 36,5 °C. Při 50 °C se snižuje u polioviru infekčnost úměrně s antigenitou, při 36,5 °C klesá antigenita pomaleji než infekčnost. Majer et al. (1965) pozorovali, že inaktivace infekčnosti polioviru při 37 °C probíhá rychleji než destrukce fyzikální stavby viru.

Podle našich výsledků byl u všech kmenů NDV zachován po 10 dnech působení teploty 37 °C ještě zjištělný stupeň infekčnosti, dosahující v jednotlivých případech titru vyššího než 10^4 TKID₅₀. Toto zjištění je poněkud rozdílné od

údajů Tolby et al. (1962), podle nichž byla HA aktivita 3 kmenů NDV, skladovaných v zatavených zkumavkách při teplotě +10, 20–30 a 37,5 °C, narušena během 7 dní velmi nepatrně a jen u jednoho kmene byl zaznamenán pokles o více než 1 stupeň ředění proti výchozí hodnotě. Teplota 37,5 °C však výrazně redukovala infekčnost pro KE u 2 kmenů během 3 dní a po 7 dnech byla téměř úplně inaktivována infekčnost všech vyšetřovaných kmenů NDV.

Naším zjištěním se velmi blíží výsledky dosažené L a r s k i m (1965), který zkoumal termostabilitu kmene R a La Sota při 50 °C a 37 °C za působení stabilizačních roztoků a 0,9% NaCl jako kontroly. Infekciozita kmene R v AAT, ředěných rovným dílem fyziologickým roztokem byla inaktivována při 37 °C do 14 dní, u kmene La Sota do 11. dne. Některé rozdíly je možno vysvětlit tím, že jsme ředili AAT pufovaným fyziologickým roztokem 1:10 a tím, že Larski jednotlivé vzorky před inokulací zmrazoval v suchém ledu, přičemž zjistil, že vzorek, který nebyl zmražen si uchoval infekční titr o 30 % déle než vzorek zmražený. Naproti tomu B r a n d l y (1959) uvádí, že virus v AAT byl infekční ještě po 3 týdnech při 37,2 °C, ale desetinásobně ředěné tekutiny ztrácely svou infekčnost mnohem rychleji.

V souhlasu se závěry našeho pozorování jsou výsledky M u s s e r a et al. (1960), kteří sledovali stabilitu viru spalniček při teplotách +6, –30 a –72 °C. Během několika týdnů skladování se bez ohledu na teplotu inaktivovalo 90 % viru a inaktivace se při dalším skladování zpomalila. Při +6 °C došlo během 54 týdnů k poklesu infekčnosti o 2,4 až 4,9 log. jednotek, při –30 °C o 1,4 až 3,1 log jednotek. Pro dlouhodobé skladování se doporučuje teplota –72 °C, při níž došlo během 54 týdnů k poklesu o 0,4 až 1,1 log jednotek. Pro několikaměsíční období stačí chladničková teplota.

Na přežívání NDV, skladovaného při –15 až –20 °C, má nejvýraznější vliv samo zmrazení, které je při daných teplotách příliš pomalé. Přesto však u kmenů mezogenních a velogenních uchovávání ve zmraženém stavu při –15 až –20 °C vyhovuje pro nouzové skladování viru do 6 měsíců. Pro skladování lentogenních kmenů NDV tento způsob nevyhovuje, protože přes zachování HA titrů v případě kmene B 1 a La Sota je po 6 měsících titr přežívajícího viru příliš nízký – 10^1 až $10^{2,2}$ TKID₅₀/0,1 ml. 50. tkáňová pasáž kmene R se po zmražení značně odlišuje od původního kmene i od 21. pasáže, což lze vysvětlit tím, že virus byl po každé tkáňové pasáži zmražen. Opakovaným zmrazováním se vyselektovala linie odolná proti nízkým teplotám.

Chladničková teplota je tedy nejvýhodnější pro krátkodobé uchování virové suspenze k účelům sérologického vyšetřování, k vakcinačním a jiným pokusným účelům, protože nejméně narušuje HA aktivitu a infekčnost viru.

S O U H R N

Infekčnost lentogenních, mezogenních a velogenních kmenů NDV v alantoamniotických tekutinách se snižuje při teplotě 37 °C během 30 dní o $10^{2,2}$ až $10^{6,6}$ TKID₅₀/0,1 ml, přičemž nejstrmější pokles se zaznamenává v prvních 10 dnech. Jen u velogenních kmenů zůstává po 30 dnech infekční titr vyšší než 10^1 TKID₅₀/0,1 ml. Hemaglutinační titry lentogenních a mezogenních kmenů klesaly nepravidelně během celého sledovaného období a po 30 dnech poklesly o 2 až 4,5 stupně dvojnásobného ředění, ale k úplné ztrátě hemaglutinační schopnosti nedošlo. U virulentních kmenů byl pokles nepatrný, nedosahující jednoho stupně ředění.

Při skladování kmenů NDV za teplot –15 až –20 °C dochází k nejvyšším ztrátám infekčnosti během mražení. U mezogenních a velogenních kmenů poklesl během 6 měsíců infekční titr o 0,8 až 3,0 log. jednotky a hemaglutinační titr se

udržel nad hodnotou 1 : 80. U lentogenních kmenů zůstaly sice zachovány hemaglutinační titry nad 1 : 80, ale infekční titr poklesl o 3,3 až 6 log. jednotek.

Při teplotě +4 °C se během 6 měsíců nenarušuje hemaglutinační aktivita vůbec a infekčnost klesá jen nepatrně: o 1,0 až 3,4 log. jednotky u vakcinačních a o 0,5 log. jednotky u virulentních kmenů.

Došlo dne 8. 6. 1966

Literatura

1. ASPLIN, F. D.: Observations on the viability of Newcastle disease virus. = „Vet. Rec.“, 61, 1949 : 156-160. — 2. BRANDLY, C. A.: Newcastle disease. In: BIESTER, H. E. - SCHWARTE, L. H.: Diseases of poultry, Ames, Iowa, 1959, 464-503. — 3. ČERNÍK, K.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekčnost některých kmenů NDV. I. Možnost charakteristiky kmenů. různé virulence pomocí inaktivace teplem. = „Vet. med“, 11, 1966 : 231-238. — 4. FARINAS, E. C.: Avian pest, a disease of birds hitherto unknown in the Phillipine Islands. = „Philippine J. Agr.“, 1, 1930 : 311-366 (cit. podle PICKEN 1964). — 5. GORDON, R. F. - REID, J. - ASPLIN, F. D.: Newcastle disease in England and Wales. = „Proc. 8th World's Poultry Congr.“, 1948 : 642. — 6. HOFSTAD, M. C. - YODER, H. W.: Inactivation rates of some lyophilized poultry viruses at 37° and 3 °C. = „Avian Dis.“, 7, 1963 : 170-177. — 7. LANCASTER, J. E.: Report to the Government of Thailand on control of poultry diseases. — Food and Agric. Organiz. of the United Nations, Rome 1957 (cit. podle LANCASTER 1962). — 8. LANCASTER, J. E.: Newcastle disease strain F. virus. A review. = „Canad. J. comp. Med. vet. Sci.“, 26, 1962 : 285-289. — 9. LARSKI, Z.: The influence of magnesium chloride on the thermal inactivation rate of NDV. = „Bull. Vet. Inst. Pulawy“, 9, 1965 : 1-7. — 10. MAJER, M. - THOMSEN, R.: Thermal inactivation of ³²P-poliovirus at 37 °C and 50 °C in the presence of NaCl with high mortality. = „Arch. ges. Virusforsch.“, 17, 1965 : 585-593. — 11. MICHALOV, J.: Štúdium epizootológie Newcastleskej choroby. = Kandid. diz. práca, Košice, 1965. — 12. MUSSER, S. J. - UNDERWOOD, G. E.: Studies on measles virus. II. Physical properties and inactivation studies of measles virus. = „J. Immunol.“, 85, 1960 : 292-297. — 13. OLESIU, O. M.: Influence of environmental factors on viability of NDV. = „Am. J. vet. Res.“, 12, 1951 : 152-155. — 14. PICKEN, J. C.: Thermostability of Newcastle disease virus. In: HANSON, R. P. a kol.: NDV — an evolving pathogen. Univ. of Wisconsin, 1964 : 167-188. — 15. RHOADES, H. E.: The effects of storage on viability of lyophilized cultures of bacteria, viruses, yeasts and molds. = „Am. J. vet. Res.“, 19, 1958 : 765-768. — 16. SKODA, R. - ŽUFFA, A.: Mor drúbeže — Pestis avium. In: KLIMEŠ, B.: Nemoci drúbeže, Praha, 1961, 205-225. — 17. TOLBA, M. K. - ESKAROUS, K. J.: Effect of temperature on the hemagglutination activities and infectivity to chick embryos of different strains of Newcastle disease and fowl-plague viruses. = „Arch. f. Mikrobiologie“, 43, 1962 : 234-244. — 18. TORLONE, V.: Osservazioni su alcuni caratteri di un ceppo di virus di Newcastle (F. di Asplin): Resistenza a diverse temperature, potere emoagglutinante e termoresistenza della emoagglutinina a 56 °C. = „Soc. Ital. Sci. Vet. Att.“, 9, 1955 : 558. — 19. YOUNGER, J. S.: Thermal inactivation studies with different strains of poliovirus. = „J. Immunol.“, 78, 1957 : 282-290.

Влияние температуры на гемагглютинационную активность и инфекционность некоторых штаммов вируса Ньюкаслской болезни — II. Изменения гемагглютинационной способности и инфекционности вируса в течение хранения при разных температурах

Инфекционность лентогенных, мезогенных и велогенных штаммов NDV*) в аллантоамниотических жидкостях при температуре 37 °C в течение 30 дней понижается на 10^{2,2} — 10^{8,6} TKID₅₀/0,1 мл**), причем наиболее резкое понижение наблюдается в течение первых 10 дней. Лишь у велогенных штаммов в продолжение 30 дней инфекционный титр остается

большим 10^1 TCID₅₀/0,1 мл. Гемагглютинационные титры лентогенных и мезогенных штаммов неравномерно понижались в течение всего изучаемого периода и в продолжение 30 дней понизились, на 2—4,5 степени двойного разбавления, однако гемагглютинационная способность полностью утрачена не была. У вирулентных штаммов понижение было незначительным, не достигающим одной степени разбавления.

При хранении штаммов NDV при температурах — 15 до — 20 °C небольшие потери инфекционной способности имели место во время замораживания: У мезогенных и велогенных штаммов в течение 6 месяцев инфекционный титр понизился на 0,8—3,0 лог. единицы, а гемагглютинационный титр остался выше величины 1:80. У лентогенных штаммов хотя гемагглютинационные титры и сохранились выше 1:80, но инфекционный титр понизился на 3,3—6 лог. единиц.

При температуре + 4 °C в течение 6 месяцев гемагглютинационная активность вообще не нарушается, а инфекционная способность понижается лишь незначительно: на 1,0—3,4 лог. единицы у вакцинационных и на 0,5 лог. единицы у вирулентных штаммов.

*) вирус псевдочумы птиц (ньюкасская болезнь)

**) инфекционная доза тканевой культуры

The Influence of Temperature on the Hemagglutination Activities and Infectivity of Some Strains of the Newcastle Disease Virus

II. Changes in the Hemagglutinability and Infectivity of the Virus in the Course of Storage at Different Temperatures

The infectivity of lentogenic, mesogenic, and of velogenic strains of the NDV in allantoamnionic fluids decreases at a temperature of 37 °C within 30 days by $10^{2,2}$ — $10^{6,6}$ TCID₅₀/0.1 ml, in which case the steepest sinking is recorded in the first 10 days. Only in velogenic strains after 30 days the infection titer remains higher than 10^1 TCID₅₀/0.1 ml. The hemagglutination titers of lentogenic and mesogenic strains sank irregularly in the course of the whole examined period, and after 30 days they sank by 2 to 4.5 degrees of a double dilution, but no complete loss of the hemagglutination activity occurred. In virulent strains the sinking was insignificant and did not reach one degree of the dilution.

In the case of a storage of NDV strains at temperatures of from — 15 to — 20 °C the highest losses of infectivity occur during the freezing. In mesogenic and velogenic strains the infection titer fell by 0.8 to 3.0 log. units in the course of 6 months and the hemagglutination titer remained above the value of 1:80. In lentogenic strains the hemagglutination titers remained above 1:80, but the infection titer sank by 3.3 to 6 log. units.

At a temperature of + 4 °C the hemagglutination activity is not disturbed at all in the course of 6 months and infectivity decreases only insignificantly: by 1.0 to 3.4 log. units in vaccination strains and by 0.5 log. units in virulent strains.

NDV = Newcastle Disease Virus

TCID = Tissue Culture Infection Dose

Einfluß der Temperatur auf die Hämagglutinationsfähigkeit und Infektiosität einiger Virusstämme der Newcastlekrankheit

II. Veränderungen der Hämagglutinabilität und Infektiosität des Virus während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen

Die Infektiosität der lentogenen, mesogenen und velogenen Stämme der Newcastlekrankheit in Allantoamnionflüssigkeit wird bei der Temperatur von 37 °C während 30 Tagen um $10^{2,2}$ bis $10^{6,6}$ TCID₅₀/0,1 ml*) herabgesetzt, wobei die schroffste Herabsetzung in den ersten 10 Tagen verzeichnet wurde. Nur bei velogenen Stämmen bleibt nach 30 Tagen der Infektionstiter höher als 10^1 TCID₅₀/0,1 ml. Die Hämagglutinationstiter der lentogenen und mesogenen Stämme senkten sich unregelmäßig während des ganzen verfolgten Zeitechnittes, und zwar nach 30 Tagen um 2 bis 4,5 Grad der Doppelverdünnung, aber es trat kein vollkommener Verlust der Hämagglutinationsfähigkeit ein. Bei virulenten Stämmen war die Herabsetzung unsignifikant und hat einen ganzen Grad der Verdünnung nicht erreicht.

*) TCID = Infektionsdosis der Gewebekultur.

Bei der Aufbewahrung der Newcastlekrankheit-Stämme bei einer Temperatur von -15 bis -20°C treten die größten Verluste der Infektiosität während der Tiefkühlung ein. Bei mesogenen und velogenen Stämmen senkte sich der Infektionstiter während 6 Monate um 0,8 bis 3,0 log. Einheiten und der Hämmagglutinationstiter hielt sich über den Wert 1 : 80. Bei lentogenen Stämmen blieben zwar die Hämagglutinationstiter über 1 : 80 erhalten, aber der Infektionstiter ist um 3,3 bis 6 log. Einheiten gesunken.

Bei einer Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ wird während 6 Monate die Hämagglutinationsfähigkeit durchaus nicht gestört und die Infektiosität setzt sich nur unsignifikant herab: um 1,0 bis 3,4 log. Einheiten bei Vakzinations- und um 0,5 log. Einheit bei virulenten Stämmen.

Adresa autorů:

MVDr. Karel Černík, Edita Černíková, Bioveta, n. p., Nitra

**PŘÍSPĚVEK KE STUDIU
KREVNÍCH BÍLKOVIN
A ČERVENÉ KREVNI SLOŽKY
PŘI PODVÝŽIVĚ SKOTU
V PRŮBĚHU BŘEZOSTI A KRÁTCE
PO PORODU**

■ Náležitě uplatnění všech preventivních opatření, zvláště na úseku zoohygieny vyžaduje hlubokou analýzu fyziologie hospodářských zvířat s cílem vyhledat a ověřit si vnější podmínky jejich prostředí, které mají na vnitřní kondici zvířete, jako ukazatelé jeho zdraví a odolnosti, podstatný vliv.

Ukolem této práce je přispět k objasnění kvantitativního složení krevních bílkovin, červených krvinek, hemoglobinu u krav českého červenostrakatého plemene v průběhu březosti a krátce po porodu v podmínkách, které z hlediska výživy a hygieny lze označit za hrubě závadné.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Jednou z nejpotřebnějších složek výživy zvířat jsou jak známo bílkoviny. Přívod krmiva bez bílkovin způsobuje po několika dnech vážné poruchy v organismu a trvalá výživa bez bílkovin končí smrtí zvířete (Zbarskij 1959). Nedostatečný přívod bílkovin v potravě je provázen tzv. hypoproteinemií, která se projevuje nejprve jako hypoproteinemie tkáňová a posléze při déle trvající karenci bílkovin dochází k hypoproteinemii krevní. Jak dokázal Quimby (1947) vyvolává však i částečné hladovění pokles krevních proteinů. Gülzov & Schlicht (1950) srovnávali složení sérových proteinů u psů usmrčených hladověním s obdobnými poměry u psů zdravých. Konstatovali, že při nedostatečné výživě došlo jak ke krevní, tak i tkáňové dysproteinemii. Vliv nedostatečné výživy na plazmatické bílkoviny studovaly pomocí papírové elektroforézy také Gajsinckaja, Lvova & Uspenskaja (1954), které zaznamenaly pokles celkového proteinu krevního a v jeho rámci pak snížení albuminové frakce a nepatrný vzestup globulinů alfa. Podobné změny krevních bílkovin popisují také Zeldis & Chow (1945). Poklesem množství plazmatického albuminu pod určitou hranici dochází k význačné poruše koloidně osmotické rovnováhy krevní plazmy vedoucí ke vzniku různých edemů. Tyto edematózní stavy zjistil při podvýživě krav Vermorel (1956) za současného poklesu celkových bílkovin krevních na 4,5 g%. Obdobný pokles této hodnoty zaznamenal u prasat při krmení chudém na bílkoviny Hannig (cit. Hojovcová & Dvořák, 1961). Nedostatečná výživa a zvláště karence bílkovin neprojevují se však pouze ve změnách poměrů plazmatických proteinů, ale trpí jí i erythropoeza. Závislost červené krevní složky na bílkovinném metabolismu je známa. Také vliv červených krvinek na přeměnu bílkovin popisuje Zbarskij (1959), který zjistil, že aminokyseliny resorbované z tenkého střeva absorbují se z krevní plazmy na erythrocyty a opět se z nich uvolňují, jestliže jich ubude v krevní plazmě.

Z tohoto příkladu vyplývá, že červená složka krevní je s metabolismem bílkovin úzce spjata a že proto nedostatečná výživa může primárně ovlivnit i poměry v krevním obrazu zvířete. Negativní efekt nedostatečné výživy a s ní spojené nízké stájové hygieny na červený krevní obraz skotu je popisován také četnými jinými autory (Schmidt, 1947, Schultze, 1957, Seils, 1962, Pravda, 1966).

MATERIÁL A METODIKA

Pokusný soubor zvířat u nichž jsme sledovali dynamiku krevních bílkovin a červeného krevního obrazu v průběhu gravidity sestával z 30 krav, z nichž 23 zvířat bylo gravidních a 7 negravidních. U všech zvířat bylo prováděno v jednoměsíčních intervalech, u gravidních zvířat od šestého měsíce březosti hematologické vyšetření, které u gravidních zvířat bylo provedeno ještě jeden měsíc po porodu. Zvířata kontrolní byla vyšetřována stejně a souběžně. Hematologické vyšetřování bylo prováděno v zimním období, kdy příslušné hospodářství nemělo zajištěnou krmnou dávku, která sestávala z hrstě sena (cca 300–500 g) a ostatní doplňovala krmná sláma (5–7 kg). Také hygienická úroveň byla do určité míry tímto ovlivněna pro totální nedostatek steliva se současným nevyhovujícím způsobem ošetřování.

Krevní bílkoviny byly sledovány pomocí papírové elektroforézy aparaturou zn. Drukoplast Kuklov v podstatě metodikou podle Hořejšího (1956) s vlastní modifikací (Hořavcová 1965).

Stanovení celkové bílkoviny krevního séra bylo prováděno refraktometricky ponorným refraktometrem MEOPHA. Koncentrace bílkovin byla stanovena na základě vypracovaných tabulek podle kalibračního grafu (Hořavcová 1965). Byly vypočítány střední chyby obou metod. K statistickému vyhodnocení výsledků bylo použito testu podle Hrubého (1961).

Množství hemoglobinu bylo stanoveno standardní metodou hemoglobimetrem GIM a přepočtem pomocí tabulek byly získány hodnoty krevního barviva v g%. Množství červených krvinek bylo rovněž zjišťováno standardní metodou baničkovou s výpočtem ve 20 obdélnících Bürkerovy komůrky.

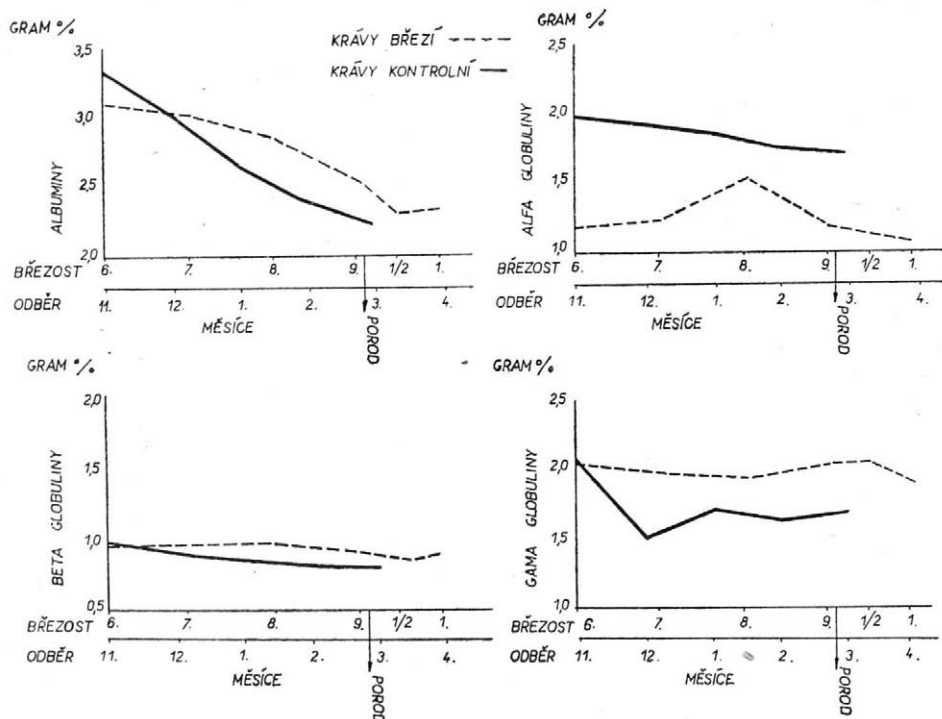
Výsledky vyšetření krevních bílkovin jsou uvedeny v příslušných grafech podle měsíců gravidity, u krav kontrolních pak podle odpovídajících intervalů hematologického vyšetření.

U všech pokusných krav byla sledována také tělesná váha, která je uvedena v průměrných hodnotách v příslušných grafech.

VÝSLEDKY PRÁCE

KRAVY BŘEZÍ

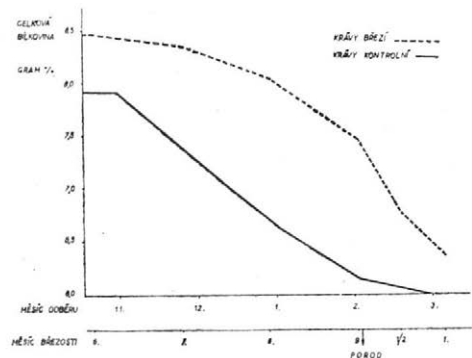
Z výsledků vyšetřování krevních bílkovin je patrné (graf 1), že albuminová frakce zaznamenala v 8. měsíci březosti v rel. % sestupný pokles až do 1. měsíce po porodu. Průkazné snížení činilo 15 % celkové hodnoty. V absolutních g% byl zaznamenán pokles již v 7. měsíci gravidity a nejvyšších hodnot dosáhl ve 14 dnech po porodu. Alfa globuliny se od 7. měsíce březosti zvýšily a zvýšení činilo v 9. měsíci 9 %. Beta globuliny nezaznamenaly v rel. hodnotách změn, v absolutních nastal v 9. měsíci březosti určitý pokles. Gama globuliny se v 9. měsíci gravidity proti 8. měsíci zvýšily o 10 % a jejich vzestup byl pozorován ještě v prvním měsíci po porodu. Celková bílkovina zaznamenala statisticky významný pokles v 8. měsíci březosti, který činil do prvního měsíce po porodu 18 % (graf 2).



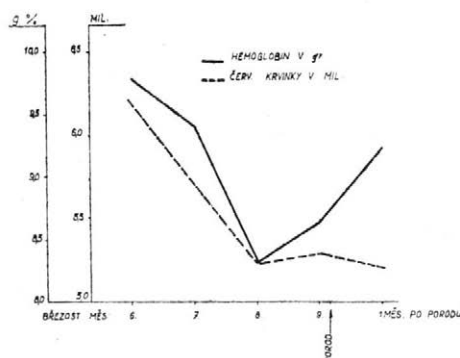
Graf 1.: Krevní bílkoviny červenostrakatých březích a kontrolních krav z JZD Boršice

Množství červených krvinek (graf 3) od 6. měsíce březosti do 1. měsíce po porodu výrazně pokleslo o 15 %. Současně jsme zjistili snížení obsahu hemoglobinu, od 6. měsíce gravidity do 8. měsíce o 12 %. S poklesem uvedených složek došlo k podstatnému snížení tělesné váhy březích krav (graf 4), který činil v průměru 20 %, tj. 80–100 kg.

Je nutné však říci, že jde o průměrné hodnoty a že se vyskytli jedinci, u nichž činil pokles tělesné váhy 30–40 %.



Graf 2.: Celková bílkovina krevního séra u březích a kontrolních krav



Graf 3.: Obsah hemoglobinu a červených krvinek krav březích

KRÁVY KONTROLNÍ

Z bílkovinných frakcí (graf 1) zaznamenaly albuminy jak v rel. % tak i v abs. g% významný sestup průkazný o 18 % výchozí hodnoty.

Alfa globuliny se od listopadu 1963 do února 1964 v rel. % zvýšily o 12 %, v absolutních g% zaznamenaly naopak mírný pokles.

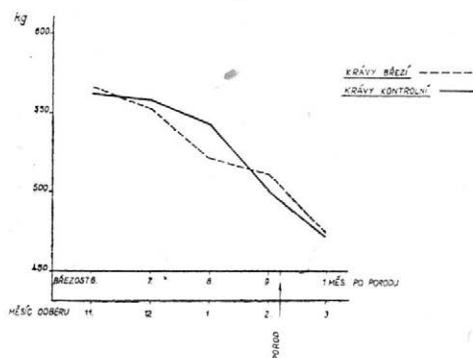
Beta globulinová frakce nezaznamenala významných rozdílů.

Gama globuliny: Signifikantní změny v rel. % nastaly až v měsíci březnu, projevující se určitým zvýšením (o 6 %) celkové hodnoty. V absolutních hodnotách není podstatných změn.

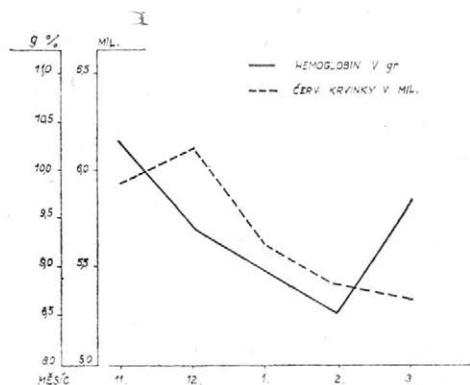
Hladina celkové bílkoviny krevní od prosince 1963 do března 1964 výrazně poklesla o 24 % celkové své výchozí hodnoty (graf 2). Množství červených krvinek (graf 5) vykazuje určitý pokles, procentuálně však nižší než u krav březích (o 11 %).

Také v množství hemoglobulinu zjistili jsme výrazný pokles, který dosáhl v měsíci únoru 29 % průměrného obsahu. V měsíci březnu však došlo k vzestupu jeho obsahu, takže pokles tu činil již jen 7,5 % původní hodnoty.

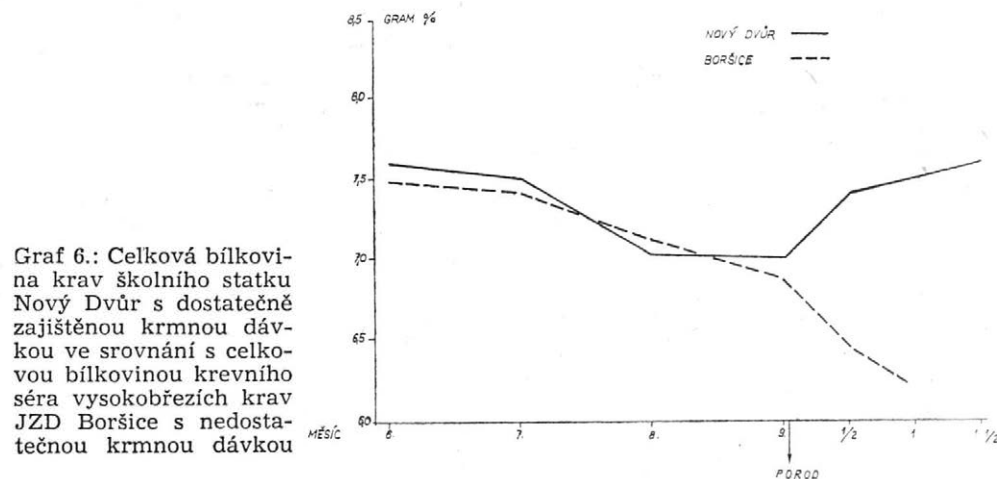
Úbytek tělesné váhy je obdobný jak u krav březích a činí v průměrných hodnotách 20 % (graf 4).



Graf 4.: Průměrná tělesná váha (kg) krav březích a krav kontrolních



Graf 5.: Obsah hemoglobinu a červených krvinek krav kontrolních — nebřezích



Graf 6.: Celková bílkovina krav školního statku Nový Dvůr s dostatečně zajištěnou krmnou dávkou ve srovnání s celkovou bílkovinou krevního séra vysokobřezích krav JZD Boršice s nedostatečnou krmnou dávkou

DISKUSE

Hodnotíme-li dosažené výsledky krevních bílkovin a červené krevní složky, lze říci, že určité změny by mohly mít souvislost s vysokou graviditou. Snížení albuminu, celkové krevní bílkoviny u vysokogavidních krav je ve shodě s literárními údaji Perka & Loebela (1959), Rakova, Prostjakova (1964) a Hojovcové (1965). Pokles těchto složek bývá však méně výrazný a činí u albuminu a celkové krevní bílkoviny 6–9 %. Po porodu se pak vrací na své původní optimum. Pokles červené složky krevní u vysokobřezích krav znamenal Spáčil, Vácha (1960). Viktorov (1953), Pravda (1959) však uvádějí, že pokles červené krevní složky u klinicky zdravých vysokobřezích krav je malý.

U našich pokusných krav však došlo k výraznějším změnám jak v krevních proteinech, tak i v červené složce krevní.

Složení hladiny albuminu činilo 15–18 % a celkového krevního proteinu 18–24 %. Pokles obsahu hemoglobinu a červených krvinek činil 12–24 %.

Též po porodu krav březích nedošlo k úpravě změn v krevních bílkovinách, což je neilépe patrné na hladině celkového krevního proteinu, jehož obsah se naopak ještě více snížil.

Změny, které nastaly jak v krevních bílkovinách tak v červené složce krevní jsou shodné u obou skupin krav jak u skupiny krav březích, tak i u skupiny krav kontrolních — nebřezích a jsou v souladu s poklesem tělesné váhy. Tím se potvrzují údaje Gajsinské (1954) a jiných autorů, že v důsledku nedostatečné výživy dochází k dysproteinemiím (hypoproteinemiím). Ty se pak jako forma tkáňová projevují úbytkem tkáňových proteinů se současným snížením tělesné váhy až celkovou kachexií zvířete. Dále se pak vyvíjí hypoproteinemie krevního séra. V našich poměrech nedošlo k výraznějším klinickým symptomům svědčícím pro určité onemocnění, mimo 3 krav, které byly pro kachexii nutně odpořeny. Stav změn, který u našich pokusných krav nastal, hodnotíme jako stav dysproteinemie projevující se poklesem tělesné váhy až sešlostí zvířat se změnami v krevních bílkovinách, hlavně s poklesem celkového krevního proteinu. V důsledku déle trvající bílkovinné karence došlo k poklesu červené složky krevní a vznikl tak určitý stupeň anemie, což je v souladu s údaji Buechlera, Gugenheima (1949), Schulze (1957) a Löwensena (1957).

ZÁVĚR

U 23 březích pokusných krav a 7 nebřezích, kontrolních, byly vyšetřovány krevní bílkoviny, obsah hemoglobinu a množství červených krvinek. Současně byla sledována tělesná váha zvířat.

Březí krávy byly sledovány od 6 měs. gravidity až do 1. měsíce po porodu, kontrolní krávy od prosince 1963 do března 1964, tj. v období, odpovídající březosti krav.

Všechna zvířata byla chována v nežádoucích podmínkách za naprostého nedostatku krmiv a stelivové slámy.

Ve vyšetřovaných krevních bílkovinách byly zjištěny dysproteinemické změny, které se projevovaly značným poklesem celkové krevní bílkoviny a poklesem hladiny albuminů. Alfa globulinová frakce se mírně zvýšila.

Hematologické vyšetřování opírající se o průběžná stanovení obsahu hemoglobinu a červených krvinek vykazovala v průběhu pokusu jak u březích krav, tak i kontrolních nebřezích významný pokles.

Obdobný trend vykazovala váhová křivka u všech pokusných i kontrolních krav.

Z dosažených výsledků lze usuzovat na výraznou závislost mezi uvedenými změnami a nežádoucími podmínkami odchovu.

Došlo dne 27. 5. 1966

Literatura

1. BUECHLER - GUGGENHEIM: Blood IV., 8., 958-964, 1949, cit. podle HOŘEJŠÍHO 1956. — 2. GAJSINSKAJA, O. O. - LVOVA, V. V. - USPENSKAJA, V. D.: Elektroforetičeskoe izučenie belkov syrovotki krovi sobaki. = „Biochimija“, 19, 1954. — 3. HOJOVCOVÁ M. - DVORÁK, M.: Vztah červeného krevního obrazu selat ke složení jejich sérových bílkovin. = „Sborník VŠZ, řada B“, 3-4, 1961, 315-324. — 4. HOJOVCOVÁ, M.: Bílkovinné spektrum a celková bílkovina krevního séra skotu za různých fyziologických poměrů. Kandidátská dis. práce, Brno, 1965. — 5. HOŘEJŠÍ, J.: Bílkoviny krevní plasmy, Praha, 1956. — 6. GÜLZOW, M. - SCHLICHT, A.: „Z. ges. exp. Med.“ 116, 56, 1950, cit. podle HOŘEJŠÍHO 1956. — 7. HRUBÝ, K.: Genetika, Praha, 1961. — 8. CHOW, B. F.: Proteins and protein hydrolysates in nutrition. New York, 1946. — 9. KARÁSEK, F.: Issledovanije krovi v veterinarnoj diagnostike. Moskva 1952. — 10. LÖWENSEN, H.: Papierelektrophoretische Serumuntersuchungen bei spontaner und experimenteller Ferkelanämie unter Berücksichtigung der Therapie. Inaug. Diss. Hannover 1957. — 11. MARTAN, P.: Příspěvek ke studiu červené složky krevní při podvýživě skotu v průběhu březosti a po porodu. Dipl. práce VŠZ, Brno 1963. — 12. PERK, K. - LOEBL, K.: Die Serum-Eiweißfraktionen in Rinder-Blut, eine chemische und Papierelektrophoretische Studie. = „Schweiz. Arch. Tierheilk.“ 101, 1959, 548. — 13. PRAVDA, D.: Krevní obraz červenostrakatého skotu. Referát, Brno 1959. — 14. PRAVDA, D.: Základní hematologické hodnoty normál. krve českého červenostrakatého skotu. Habil. Brno, 1966. — 15. PROSTJAKOV, A. P. - FORTUŠNYJ, V. A. - KOVYNIKOV, M. S.: Ob ocenke izmenenij frakcionnogo sostava syvorotočnych belkov u životnych. = „Veterinarija“, 4, 1964, 109. — 16. SEILS, H.: Der Einfluß von Ernährung und Haltungshygiene auf das Blutbild des Rindes. = „Mh. Veterinarmed.“ 17, 1962, 2, 118-121. — 17. SCHULZE, H.: Zur Bedeutung des Eisens bei der Anämie des Ferkels. Inaug. Diss. Hannover 1957. — 18. SMIDT, A.: Der Einfluß der Unterernährung auf das Blutbild des Rindes. Vet. Diss. Leipzig, 1947. — 19. SPÁČIL, F. - VÁCHA, J.: Krevní obraz dospělého červenostrakatého skotu. = Sborník ČSAV Vet. Med. 4, 239-244, 1960. — 20. VERMOREL, J.: Étude électrophorétique des sérums de bovines tuberculeux et de bovines hydrochimiques. Alfort 1956. — 21. VIKTOROV, K. P. a spol.: Rukovodstvo k praktičeskmu zanjatijam po fiziologii životnych. Moskva 1963. — 22. QUIMBY, F. H.: „Amer. J. phys.“ 151, 525, 1947, cit. podle HOŘEJŠÍHO 1956. — 23. ZELDIS, L. J. a spol.: „J. exp. Med.“ 82, 1945, 157, cit. podle HOŘEJŠÍHO 1956. — 24. ZBARSKIJ, B. I.: Biochemie I. vyd. Praha 1959.

К вопросу изучения кровяных белков и красного компонента крови при недостаточном питании крупного рогатого скота в ходе стельности и вскоре после отела

У 23 стельных подопытных коров и 7 нестельных контрольных изучались белки крови, содержание гемоглобина и количество красных кровяных телец. Одновременно велись наблюдения над телесным весом животных.

Стельные коровы наблюдались с 6 месяца беременности и до 1 месяца после отела, а контрольные коровы — от декабря 1963 г. до марта 1964 г., т. е. в продолжение периода, отвечающего стельности коров.

Все животные содержались в неподходящих условиях, в условиях абсолютного недостатка кормов и подстилочной соломы.

В исследуемых белках крови были установлены диспротеинемические изменения, которые проявились в значительном уменьшении количества общих белков крови и в понижении уровня альбуминов. Альфа глобулиновая фракция несколько повысилась.

Гематологическое исследование, опирающееся на непрерывное определение содержания гемоглобина и красных кровяных телец, в ходе опыта показало его значительное уменьшение как у стельных, так и у контрольных коров.

Аналогичный тренд показала кривая веса у всех подопытных и контрольных коров. На основе полученных результатов можно судить о тесной зависимости между упомянутыми изменениями и нежелательными условиями содержания животных.

On the Study of the Blood Proteins and of the Red Blood Component in Undernourished Cattle in the Course of Pregnancy and Shortly after Parturition

In 23 pregnant, experimental cows and in 7 non-pregnant control animals blood proteins, the hemoglobin content, and the quantity of red blood corpuscles were investigated. Simultaneously also the body weight of the animals was examined.

The pregnant cows were examined beginning from the 6th month of gravidity until one month after parturition, the control cows were checked from December 1963 until March 1964, i. e. in the period corresponding to the pregnancy of the experimental cows.

All animals were kept under undesirable conditions with an absolute lack of feeds and straw litter.

In the examined blood proteins dysproteinemic changes were found, which resulted in a considerable decreasing of the blood protein total and in a lowering of the albumin level. The alpha globulin fraction showed a slight increase.

Hematological examination based on a current determination of the hemoglobin content and of red blood corpuscles revealed a significant decrease in the course of the experiment both in pregnant cows and in the non-pregnant control animals.

A similar trend was shown also by the weight curve of all experimental and control cows.

On the basis of the results obtained it is possible to assume the existence of a pronounced mutual dependence between the mentioned changes and undesirable conditions of rearing.

Beitrag zum Studium der Bluteiweißstoffe und der roten Blutkomponente bei der Unterernährung des Rindes während der Trächtigkeit und kurz nach dem Abkalben

Bei 23 trächtigen Versuchskühen und 7 nicht trächtigen Kontrollkühen wurden die Bluteiweißstoffe, der Hämoglobingehalt und die Menge der roten Blutkörperchen untersucht. Gleichzeitig wurde das Körpergewicht der Tiere verfolgt.

Die trächtigen Kühe wurden vom 6. Monat der Gravidität bis zu 1. Monat nach dem Abkalben verfolgt, die Kontrollkühe vom Dezember 1963 bis März 1964, d. i. in dem Zeitabschnitt, der der Trächtigkeit der Kühe entspricht.

Alle Tiere wurden in nicht entsprechenden Bedingungen, bei einem absoluten Mangel an Futter und Streustroh gehalten.

In den untersuchten Bluteiweißstoffen wurden dysproteinämische Veränderungen festgestellt, die durch eine bedeutende Herabsetzung des gesamten Gehaltes an Bluteiweißstoffen und durch eine Herabsetzung des Albuminniveaus zum Vorschein kamen. Die Alpha-Globulin-Fraktion hat sich mäßig erhöht.

Die hämatologische Untersuchung, die sich an die fortlaufende Feststellung des Gehaltes an Hämoglobin und an roten Blutkörperchen stützt, wies während des Versuches sowohl bei trächtigen Kühen, als auch bei nicht trächtigen Kontrollkühen eine bedeutende Herabsetzung auf.

Einen ähnlichen Trend hat die Gewichtskurve bei allen Versuchs- und Kontrollkühen aufgewiesen.

Aus den erreichten Ergebnissen kann man auf eine bedeutende Abhängigkeit zwischen den angeführten Veränderungen und unerwünschten Bedingungen der Aufzucht schließen.

Adresa autorů:

MVDr. Marie Hojovcová, CSc., VŠZ — veterinární fakulta, II. interní klinika Brno, Palackého 1-3, MVDr. Drahošlav Pravda, VŠZ, agronomická fakulta, katedra veterinárních disciplín, Brno, Zemědělská 1

Důležitým předpokladem rozvoje zemědělské výroby je cílevědomě organizovaná a soustavná činnost zemědělského výzkumu a zavádění získaných poznatků do praxe. O stavu zemědělského výzkumu informuje Ústav vědeckotechnických informací MZLH každoročně vydávanou publikací

PŘEHLED VÝSLEDKŮ VĚDECKOVÝZKUMNÝCH ÚKOLŮ

která obsahuje anotované záznamy z výzkumných, kandidátských, disertačních a habilitačních prací, řešených ve výzkumných ústavech zemědělských, na vysokých školách a ve výzkumných ústavech ČSAV a SAV z oborů

ekonomika
mechanizace
půdoznalství
meliorace
rostlinná výroba
živočišná výroba
veterinářství

Dosud vyšlo: čtyřdílná publikace za léta 1956–1963, zahrnující na 1132 stránkách 1100 záznamů, přehled za rok 1964 (342 stran), přehled za rok 1965 (328 stran). V prvním čtvrtletí příštího roku vyjde soubor výzkumných prací za rok 1966.

Přehled přispívá k snazší a rychlejší orientaci v řešených výzkumných úkolech a zároveň ukazuje, které problémy jsou stále aktuální a zda byly v zemědělském provozu dostatečně realizovány.

Cena samostatné publikace je 20,— Kčs, cena čtyřdílného souboru (v omezeném množství) je 50,— Kčs.

Objednávky zasílejte na adresu:

Ústav vědeckotechnických informací MZLH

Praha 2, Slezská 7

**VLIV GRAVIDITY
NA AKTIVITU NĚKTERÝCH ENZYMŮ
(GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH)
A BILIRUBINU U KRAV
A NOVOROZENÝCH TELAT**

■ V předcházejících pracích jsme se zabývali vlivem některých exogenních a endogenních faktorů na aktivity enzymů v krevním séru domácích zvířat (Šlesingr 1965). Bylo prokázáno, že aktivity sledovaných enzymů mohou být podstatně ovlivněny nejen chorobami jaterními, změnami srdečního svalů nebo pankreatu, ale také chirurgickými chorobami a zákroky (Šlesingr 1965), nebo rovněž jinými vnitřními poruchami např. onemocněním dýchacího aparátu (Šlesingr 1965). Ovlivnění aktivity enzymů v krevním séru může nastat dále fyzickou námahou nebo insuflací vzduchu do mléčné žlázy, přičemž se aktivuje hlavně aldoláza, kdežto aktivity transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové a glutamové pyrohroznové uchovávají původní aktivity (Tarkiewicz 1964). Aldoláza se aktivuje za 24 hod. po zákroku a do 72 hod. se vrací k normálu. O vlivu hladovění na aktivity enzymů u domácích zvířat jsou zatím názory rozdílné (Neuman 1960, Šlesingr 1965). O aktivitách sledovaných enzymů je známo, že nejsou druhově specifické. Výjimku tvoří pouze leucinaminopeptidáza, které se připisuje druhová i orgánová heterogenita.

Vzhledem k uvedeným vlastnostem enzymů a probádaným syntetizujícím poznatkům za fyziologických a patologických stavů u zvířat, zvolili jsme si jako pracovní hypotézu srovnání aktivity enzymů u vysokobřezích krav a u narozených mláďat těchto krav. Výsledky mají sloužit později k diagnostice gravidní toxikemie u březích zvířat.

Zdroje aktivit enzymů mohou být u mláďat dvojího původu. Buďto se aktivity enzymů šíří transplacentární cestou do fěta nebo může být i podstatným zdrojem aktivit enzymů mlezivo. Vliv mleziva na aktivity enzymů u sledovaných mláďat jsme v práci nesledovali.

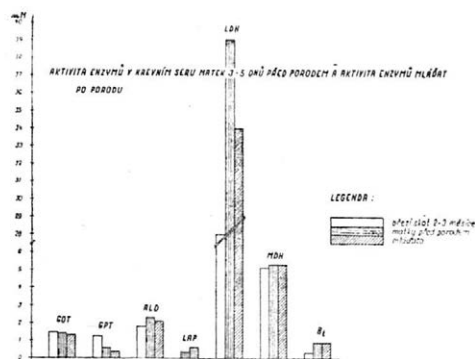
Vzhledem k dosavadním poznatkům, že např. při acetonemii v nesouladu se značnými změnami jaterního paranchymu nebývají aktivity specifických enzymů vysoké, je nutné současně volit sledování stabilnějších metabolitů jako jsou např. žlučová barviva a jiné specifické jaterní testy. Tímto způsobem může být diferencován zdroj aktivit jinými cestami, jako je např. u mláďat transplacentární cesta nebo cesta alimentární.

METODIKA

Aktivity enzymů transamináz kyseliny glutamové oxaloctové (GOT), kyseliny glutamové pyrohroznové (GPT), aldolázy (ALD), leucinaminopeptidázy (LAP), dehydrogenázy kyseliny mléčné (LDH) a jablečné (MDH) jsme sledovali u skupiny 56 krav 2–3 měsíce březích. Tím jsme získali základní po-

I. Hladina celkového bilirubinu a aktivit enzymů

	Počet	Bt mg%	GOT	GPT
			Mikromoly (1 ml/1 hod/37°C)	
Krávy březí 2–3 měsíce	56	$\bar{x} = 0,38$ 0,07 – 0,6 $S_{\bar{x}} = 0,048$	1,6 1,3 – 2,0 0,11	1,27 1,0 – 1,5 0,087
Matky před porodem	47	$\bar{x} = 0,9$ 0,34 – 1,51 $S_{\bar{x}} = 0,013$	1,4 0,6 – 3,8 0,08	0,6 0,3 – 1,0 0,07
	statist. hodnoty č. 1 a 2	$P < 0,01$		$P < 0,01$
Telata 5 hod. po narození	47	$\bar{x} = 0,9$ 0,45 – 1,58 $S_{\bar{x}} = 0,032$	1,3 0,27 – 3,5 0,073	0,4 0,131 – 1,0 0,0196
	statist. hodnoty č. 2 a 3			



rovnávací hodnoty aktivit. Získat krevní sérum 3–5 dnů před porodem od této skupiny krav se nám podařilo pouze u 47 kusů. Příčinou byl protrahovaný a patologický porod nebo mrtvá mláďata. U stejného počtu narozených mláďat uvedených matek byly sledovány aktivity enzymů v krevním séru. Krev od mláďat byla získávána před prvním sáním mleziva, maximálně do 5 hod. po porodu.

Krev byla odebírána u krav i mláďat z *vena jugularis*, po koagulaci od-

centrifugována a do 5 hod. podrobena laboratornímu šetření. LAP nebyla sledována u krav ve druhém až třetím měsíci březosti. Proto není v práci hodnocena T testem. Na použitou metodiku stanovení bilirubinu a aktivit enzymů odkazujeme do literárních citací (P o j e r 1963, J i r s a 1955, R u s ň á k 1963).

Ke srovnání hodnocení malikodehydrogenázy a bilirubinu bylo použito průkazu korelace Spearmanovým korelačním koeficientem.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Při porovnávání celkového bilirubinu u krav 2 až 3 měsíce březích s kravami 3–5 dnů před porodem, je celkový bilirubin u vysoko březích krav průkazně zvýšen. To neodpovídá údajům H u h n a (1962), který nezjistil změny v hla-

ALD	LAP	SDH	LDH	MDH
Mikromoly (1 ml/1 hod/37°C)				
1,61	—	0,06	27,3	4,8
1,2 — 2,2	—	0,0 — 0,21	22,0 — 31,9	4,2 — 5,5
0,197	—	0,045	2,78	0,33
2,3	0,34	—	39,0	5,3
0,84 — 7,4	0,15 — 0,88	—	16,5 — 75,0	2,5 — 12
0,038	0,092	—	3,9	0,82
$P < 0,01$	nehodn.	—	$P < 0,01$	$P < 0,05$
2,1	0,6	—	34,0	5,3
1,08 — 3,9	0,15 — 1,65	—	21,0 — 66,0	3,0 — 10,0
0,071	0,031	—	3,1	0,93
	$P < 0,05$	—	$P < 0,05$	

dinách bilirubinu vlivem březosti. U aktivity GOT jsme zjistili nepatrný pokles aktivity před porodem. Nižší aktivita GOT nežli u matek byla u mládat. Vlivem pokročilé březosti byl vysoce průkazný rozdíl v poklesu aktivity GPT. Také u mládat byla její aktivita nižší nežli u matek. Naopak vysoce průkazná byla aktivita ALD u matek před porodem. Poněkud snížená proti matkám byla aktivita ALD u mládat. V porovnání s člověkem ($1,8 \mu\text{M}$) jsme naměřili nízkou aktivitu LAP u krav před porodem a také u mládat. Rovněž u jiné skupiny nebřezích krav, kterou zde neuvádíme, jsme prokázali nízkou aktivitu LAP ($0,27 \mu\text{M}$). Uvádí se, že se LAP vysoce aktivuje u člověka během gravidity (Lettowová 1965).

Záznamy o aktivitách sledovaných enzymů jsou nesporné. U těhotných žen sledovala aktivity GOT, GPT a ALD Pojerová (1959). V tomto stavu veliké fyziologické přestavby organismu zjistila nepatrný vzestup aktivit GOT a pokles GPT během gravidity žen. Výrazněji se chovala aktivita ALD v posledním měsíci těhotenství. Zvýšila se bezprostředně před porodem. Uvedené chování ALD u žen v těhotenství je shodné s naším pozorováním u březích krav. Aktivita GOT se zvedla pouze nepatrně u žen před porodem. Aktivita GPT u žen naopak před porodem poklesla. U krav před porodem jsme zaznamenali analogické poměry těchto enzymatických aktivit s tím, že také GOT mírně poklesla. U feta naměřila autorka nízké hodnoty aktivity ALD, přičemž poukazuje na odlišný metabolismus feta a matky. U telat po narození jsme naměřili téměř shodné aktivity ALD s matkami.

Naše výsledky aktivit LDH a MDH zjišťované u krav před porodem odpovídají výsledkům Hu h n a a spol. (1962). Obě aktivity byly zvýšené, a tato elevace aktivit pravděpodobně přímo souvisí s funkcí placenty. Podle autorových

údajů neaktivovala se GOT a GPT, což rovněž odpovídá našemu zjištění. Nízká aktivita GOT a GPT je současně důkazem fyziologické funkce jater u vyšetřovaných březích zvířat.

Na základě tohoto poznatku, tj. fyziologických hladin aktivit obou transamináz u zdravých březích krav, je umožněno sledováním aktivit GOT a GPT včasné odhalovat poruchy orgánových funkcí během gravidity a předcházet rovněž v průběhu březosti případným toxikemiím.

Daleko méně průkazné byly hodnoty aktivit enzymů u mláďat, srovnáme-li je s naměřenými aktivitami u matek. Pouze aktivita LAP byla u mláďat průkazně zvýšená, kdežto LDH byla naopak průkazně snižena. U ostatních enzymatických aktivit se hodnoty pouze nepatrně lišily. Uvedené naše hodnoty pro aktivitu GOT a GPT u telat odpovídají údajům aktivit GOT a GPT, které zjistila M a d ě r o v á a spol. (1963) v období před sáním narozených telat. Aktivita MDH v krevním séru telat odpovídala aktivitě matek před porodem. Toto zjištění bylo opodstatněno použitím Spearmanova korelačního koeficientu ($r_s = 0,82$). Také hodnoty žlučových barviv byly po vyhodnocení korelačním faktorem u mláďat analogické s matkami.

SOUHRN

V práci jsme sledovali hladinu celkového bilirubinu, aktivitu transaminázy kyseliny glutamové oxalocetové, kyseliny glutamové pyrohroznové, aldolázy, leucinaminopeptidázy, dehydrogenázy kyseliny mléčné a jablečné u krav v druhém a třetím měsíci březosti a tyto výsledky jsme porovnali s aktivitami 3–5 dnů před porodem. Stejně parametry jsme sledovali u narozených telat těchto krav před prvním sáním.

Zvýšenou hladinu celkového bilirubinu jsme naměřili u krav před porodem (0,9 mg %). U telat odpovídala hladina celkového bilirubinu hladině bilirubinu naměřené u matek před porodem.

Vlivem vysoké březosti jsme zjistili zvýšenou aktivitu aldolázy (2,3 μM), laktikodehydrogenázy (39,0 μM) a malikodehydrogenázy (5,3 μM) u krav v intervalu 2–5 dnů před porodem. Nízká aktivita leucinaminopeptidázy byla zjištěna u vysoce březích krav (0,34 μM) a u mláďat (0,6 μM). Transaminázy kyseliny glutamové oxalocetové (1,4 μM) a transaminázy kyseliny glutamové pyrohroznové (0,6 μM) se během gravidity neaktivovaly.

Naopak byla zaznamenána nižší aktivita GOT a GPT u krav před porodem.

U narozených telat byla naměřena poněkud nižší aktivita transaminázy kyseliny glutamové oxalocetové, transaminázy kyseliny glutamové pyrohroznové, aldolázy a dehydrogenázy kyseliny mléčné nežli u březích krav. Dehydrogenáza kyseliny jablečné vykázala shodné výsledky aktivity s matkami. Aktivita leucinaminopeptidázy byla naopak poněkud vyšší u telat než v krvi vysoko březích krav.

Došlo dne 20. 8. 1965

Literatura

1. DOTTA, U. - BALBO, T. - GAZOLA, A.: Serum levels of GOT and GPT in healthy calves and in calves with myodystrophy. = „Zooprofilassi“, 19, 1964 : 553-564.
- 2. GERBER, H.: Aktivitätsbestimmungen von Serumenzymen in der Veterinärmedizin. = „Schw. A. Thk.“, 10, 1963 : 529-550.
- 3. HUHN, J. E. - LUPKE, H.: Leberfunktion des Rindes während der Trächtigkeit und in Puerperium. = „B. M. t. Wschr.“ 19, 1962 : 367.
- 4. LETTOW, E. - JAEGER, Ch.: Bestimmung der LAP Aktivität im Serum trächtiger Hündinnen. = „Zbl. f. Vet. Med.“ 4, 1965 : 388-394.
- 5.

LETTOW, E. - JAEGER, Ch.: Die Leucin-Aminopeptidase-Aktivität im Serum klinisch gesunder Hunde. = „T. Um.“ 6, 1963 : 294. — 6. MADĚROVÁ, V. - NEUMAN, V. - KOZUMPLÍK, F.: Vývoj transaminázové aktivity krevního séra v ranném postnatálním období. = Sb. VŠZ v Brně, Spisy fakulty veterinární, 11, 1963 : 187. — 7. NEUMAN, V. - MADĚROVÁ, V.: Vliv hladovění na aktivitu GOT a GPT u zdravých koní. = „Vet. med.“ 11, 1960 : 809. — 8. PEHRSON, B. - CARLSTRÖM, G.: Variations in GOT and GPT levels in bovine blood serum during a lactation. = „Nord. Vet. Med.“ 12, 1964 : 922-966. — 9. PETTERSON, D. S.: Some liver enzyme levels in the late pregnant and early parturient ewe and the effect of dietary restriction in late pregnancy. = „J. Agric. Sci.“ 2, 1964 : 345-352. — 10. POJER, J. a spol.: Enzymologie srdečního infarktu. = Thomayerova sbírka č. 421, St. zdravot. naklad. Praha. 1963, 197 s. — 11. POJEROVÁ, A. - TOVÁREK, J.: On enzymatic activity in the period. = Acta paediat. (Uppsala), 48, 1959 : 2113. — 12. POJEROVÁ, A. - TOVÁREK, J.: Serum Transaminasen u. Serumaldolase vor, während und nach der Geburt. Gynaecologia (Basel), 148, 1959 : 393. — 13. SINDELÁŘOVÁ, K. - NEUMAN, V. - KUDELKA, E.: O vztahu mezi enzymatickou aktivitou krevního séra a mléka při poškození jater a vemene. = „Vet. med.“ 6, 1965 : 363. — 14. ŠLESINGR, L.: Karence potravy a její vliv na aktivitu některých enzymů, krevních bílkovin, bilirubinu u koní a skotu. = „Vet. med.“ 4, 1965 : 233. — 15. ŠLESINGR, L.: Aktivita GOT, GPT a ALD u koní v séru s interními a chirurgickými chorobami. = „Vet. med.“ 8, 1965 : 477. — 16. ŠLESINGR, L.: Zu den Enzymaktivitäten der GOT, GPT, ALD, LAP, LDH und MDH bei der Grippebronchopneumonie der Schweine. = „Mh. Vet. Med.“ 14, 1965 : 573. — 17. TARKIEWICZ, S. - GLAZER, S.: Wplyw insulacji wymienia u krow na aktywność GOT, GPT i ALD w surowicy krwi. = Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, sectio DD, sv. 19, 1964 : 189-194. — 18. TABKIEWICZ, S.: Badania porównawcze transaminazy GOT a GPT w płynie otrzewnowym i surowicy klinicznie zdrowego bydła. = Ann. Univ. M. Curie-Skłodowska, sectio DD, 18, 1963 : 99-107. — 19. TETTENBORN, M.: Fermentaktivitätsbestimmungen in der Allantoisflüssigkeit von Hühnerembryonen nach exp. Infektion mit verschiedenen Virusarten. = „Zbl. f. Bakteriolog., Parasitenkunde, Infektionskr. und Hygiene“ 196, 1965 : 13-22. — 20. JIRSA, M. a spol.: Příprava kalibračních křivek s koloidním bilirubinem. = Č. L. Č. 94, 1955 : 1036. — 21. RUSŇÁK, St.: Úprava metodiky stanovení přímoreagujícího bilirubinu v séru. = „Scripta medica“, 36, f. 1-2, 1963 : 47-54.

Влияние беременности на активность некоторых ферментов (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MD) билирубина у коров и у новорожденных телят

В работе изучался уровень общего билирубина, активность трансаминазы глутаминовой оксалоуксусной кислоты, глутаминовой пировиноградной кислоты, алдолазы, лейцинаминопептидазы, дегидрогеназы молочной и яблочной кислоты у коров на втором и третьем месяце беременности и за 3—5 дней до родов. Такие же параметры изучались у новорожденных телят до первого сосания.

Повышенный уровень общего билирубина был отмечен у коров в интервале 3—5 дней до родов (0,9 мг%). У телят уровень общего билирубина отвечал тому уровню билирубина, который был отмечен у маток до родов.

Под влиянием поздней беременности была отмечена повышенная активность алдолазы (2,3 мкМ), лактодегидрогеназы (39,0 мкМ) и маликдегидрогеназы (5,3 мкМ) в интервале 2—3 дней до родов. Низкая активность лейцинаминопептидазы была установлена у коров в поздней беременности (0,30 мкМ), у молодняка (0,6 мкМ). Глутаминовая оксалоуксусная (1,4 мкМ) и пировиноградная (0,6 мкМ) трансаминаза в течение беременности неактивировалась.

Наоборот, была отмечена более низкая активность GOT и GPT у коров перед родами.

У новорожденных телят была установлена несколько более низкая активность трансаминазы глутаминовой оксалоуксусной кислоты, трансаминазы глутаминовой пировиноградной кислоты, алдолазы и дегидрогеназы молочной кислоты, чем у стельных коров. Дегидрогеназа яблочной кислоты показала подобные результаты активности с матерями. Активность лейцинаминопептидазы была, наоборот, несколько выше у телят, чем в крови высокостельных коров.

ALD = алдолаза

LDH = дегидрогеназа молочной кислоты

MD = дегидрогеназа яблочной кислоты

The Influence of Pregnancy on the Activity of some Enzymes (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH) and on Bilirubin in Cows and Newborn Calves

In this work we have investigated the level of total bilirubin, further the activities of glutamic oxaloacetic acid and glutamic pyruvic acid transaminases, of aldolase, leucinamidopeptidase, lactic and malic dehydrogenases in cows in the second and third months of pregnancy and 3–5 days before parturition. The same parameters were followed in newborn calves before their first sucking.

We have found an increased level of total bilirubin in cows in intervals of 3–5 days before parturition (0.9 mg%). The level of total bilirubin in calves corresponds to that measured in their mothers before the parturition.

We have ascertained an increased activity of aldolase (2.3 mM) due to the final stage of pregnancy, then lactic dehydrogenase (39.0 mM) and malic dehydrogenase (5.3 mM) in an interval of 2–3 days before parturition. A low activity of leucinamidopeptidase was found in cows in advanced stages of pregnancy (0.34 mM) as well as in the young (0.6 mM). Glutamic oxaloacetic (1.4 mM) and pyruvic transaminases (0.6 mM) did not become activated during pregnancy. On the contrary, a lower activity of GOT and GPT was recorded in cows before parturition.

In the newly born calves measuring revealed a somewhat lower activity of the transaminases of glutamic oxalacetic acid, of glutamic pyruvic acid, and of the aldolase and dehydrogenase of lactic acid than was the case in pregnant cows. The dehydrogenase of malic acid showed the same results as was the activity in mothers. On the other hand, the activity of leucinaminopeptidase was somewhat higher in calves than in the blood of highly pregnant cows.

GOT = glutamic oxalacetic acid

ALD = aldolase

GPT = glutamic pyruvic acid

LDH = lactic dehydrogenase

LAP = leucinaminopeptidase

MDH = malic dehydrogenase

Einfluß der Gravidität auf die Aktivität einiger Enzyme (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH) und Bilirubin bei Kühen und neugeborenen Kälbern

In dieser Arbeit verfolgte man das Niveau vom gesamten Bilirubin, die Aktivität der Transaminase der Glutamin-Oxalacetat, der Glutamin-Brenztraubensäure, Aldolase, Leucinaminopeptidase, Dehydrogenase der Milch- und Apfelsäure bei Kühen im zweiten und dritten Trächtigkeitsmonat; diese Ergebnisse wurden mit den Aktivitäten 3–5 Tage vor dem Abkalben verglichen. Die gleichen Parameter verfolgte man auch bei geborenen Kälbern von diesen Kühen vor dem ersten Saugen.

Das erhöhte Niveau des gesamten Bilirubins haben wir bei Kühen vor dem Abkalben (0.9 mg%) gemessen. Bei Kälbern entsprach das Niveau des gesamten Bilirubins dem bei Kühen vor dem Abkalben gemessenen Bilirubin-Niveau.

Infolge der hohen Trächtigkeit stellten wir eine erhöhte Aktivität der Aldolase (2.3 μ M), der Laktatdehydrogenase (39.0 μ M) und Malatdehydrogenase (5.3 μ M) in einem Intervall von 2–5 Tagen vor der Geburt fest. Die niedrige Aktivität der Leucinaminopeptidase wurde bei hochträchtigen Kühen (0.34 μ M) und auch bei Kälbern (0.6 μ M) ermittelt. Die Glutamin-Oxalacetat- (1.4 μ M) und Brenztraubentransaminase (0.6 μ M) wurde während der Gravidität nicht aktiviert. Es konnte im Gegenteil eine niedrigere Aktivität der GOT und GPT bei Kühen vor dem Abkalben verzeichnet werden.

Bei geborenen Kälbern wurde eine ein wenig niedrigere Aktivität der Transaminase der Glutamin-Oxalacetat, der Glutamin-Brenztraubensäure, der Aldolase und Dehydrogenase der Milchsäure als bei trächtigen Kühen gemessen. Die Dehydrogenase der Apfelsäure wies übereinstimmende Ergebnisse der Aktivität wie die Mütter auf. Die Aktivität der Leucinaminopeptidase war im Gegenteil bei Kälbern etwas höher als im Blut hochträchtiger Kühe.

GOT = Glutamin-Oxalacetat

ALD = Aldolase

GPT = Glutamin-Brenztraubensäure

LDH = Laktatdehydrogenase

LAP = Leucinaminopeptidase

MDH = Malatdehydrogenase

Adresa autora:

MVDr. Lubomír Šlesinger, Výzkumný ústav krmivářský, Pohořelice

■ Dehydrogenace, které jsou katalyzovány pyridinnukleotidy, probíhají přes nestálý intermediát radikálové povahy, jak bylo experimentálně prokázáno paramagnetickou spinovou resonancí (Michaelis L., 1946 — Commoner B., Lippincott, B. B., Passoneau, J. V., 1958). Podporou radikálového mechanismu jsou pozorování Barrona (Barron, E. S. G., 1957), který použil záření jako zdroj radikálů.

Radikálový charakter enzymatických reakcí, vyžadujících jako koenzymy pyridinnukleotidy (dále PN) nebo FAD*), poskytuje do jisté míry novou možnost objasnění biochemických reakcí po ozáření. Možnost primárního ovlivnění těchto koenzymů vytváří pak nové hledisko při posuzování nemoci z ozáření a spolu s faktorem strukturální uspořádanosti podává nový aspekt na časnou biochemickou poruchu v ozářeném organismu.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Radiochemické účinky expozice x-paprsky *in vitro* na pyridinové koenzymy ukázaly jednak značnou možnost reversibilního poškození NAD (Hug, O., Schachinger, L., 1959), jednak značnou roli zvolené dávky a konečně možnost interpretace reversibility poškození na NADH₂ (Adelstein, S. J., Mee, L. K., 1963). Zdá se, že po ozáření dochází k alteraci buď cellulárního mechanismu formou poklesu poměru NAD/NADH₂ nebo že právě NADH₂ je nejcitlivější složkou pro přímý účinek radikálů jak dokumentuje na radiolýze NADH₂ Adelstein (Adelstein, S. J., Mee, L. K., 1963). Kühn (Kühn, H., 1963) přirovnává účinek ionizujícího záření na NAD k destruktivním účinkům alkálie na oxydovaný pyridinnukleotid. K oxydaci NADH₂ na NAD jako projevu nepřímého efektu záření dochází podle Kühna (Kühn, H., 1963) *in vitro* po dávce 50 000–144 000 r.

Hladina PN *in vivo* je z radiobiologického hlediska poměrně málo propracována. Eichel a Spirtes (Eichel, H. J., Spirtes, M. A., 1955) pozorovali po expozici dávkou 980 r pokles NADH₂ v jaterní tkáni krys o 32 %, když korespondující změnu NAD nezaznamenali, podobně jako bez efektu zůstalo použití dávky 700 r. Pokles totálních PN (49 %) v intervalu 3 hod. po celkové expozici 800 r popisují Šonka a spol. (Šonka, J., Hilgertová, J., Pospíšil, J., Dienstbier, Z., 1962), pokles NAD v časných intervalech po ozáření dávkami 500–25 000 r (až 44 %) ve varlatech, slezině a játrech uvádí Alterbrunn (Alterbrunn, H.-J., 1964).

Dostí častým modelem pro studium vlivu záření nebo alkylačních látek jsou tkáňové kultury, i když lze mít výhrady k transformaci takto získaných poznatků na situaci *in vivo*, zvláště jsou-li touto cestou vyloučeny veškeré neurohumorální regulace. Pozorované poklesy v hladinách PN, především NAD o 20–50 % (Rüter, J., Vachek, H., Oldekop, M., Wüppen, I., Hilz, H., 1966 — Liss, E., Klinke,

*) Vysvětlivky zkratk jsou uvedeny v závěru práce.

F., Palme, G., 1966) vůči kontrolním hodnotám, jsou vysvětlovány především poruchou syntetického procesu NAD, zvláště ovlivněním intrajaderného enzymu NAD pyrofosforylázy a zároveň i prudkým vyplavováním nikotinamidu z buněk a tím vytvořenými předpoklady pro deinhibici NAD glykohydrolázy, uvolňované z mitochondrií a jader do cytoplazmy.

Zhruba 10 % PN krysích jater je lokalizováno v mitochondriálních částicích, když především jsou zastoupeny NADPH₂ a NAD, podstatně méně se vyskytuje NADP a NADH₂ (Hori, K., Mochizuki, S., Fujino, Y., 1959). Ionizující záření vyvolává již velmi brzy po expozici změny ve struktuře mitochondriálních částic. Restituce těchto změn je pozorovatelná již v intervalu 6 hod. po ozáření, jak bylo prokázáno elektronovou mikroskopií (Hori, K., Mochizuki, S., Fujino, Y., 1959). Po ozáření je rovněž popisován pokles absolutního počtu mitochondrií (Noyes, P. P., Smith, R. E., 1959) a dále pokles v procesech oxydativní fosforylace (Hall, J. C., Goldstein, A. L., Sonneblick, B. P., 1963), uskutečňující se v neporušených mitochondriích. Útlum oxydativní fosforylace po ozáření je však pouze dočasný a k úpravě dochází do 24 hod. po expozici. Proces oxydativní fosforylace je úzce spjat s oxydací NADH₂, avšak izolační postup může již během preparace mitochondrií narušit fyziologickou hladinu a redox poměr PN, protože po dobu vlastní izolace jsou mitochondrie v nefyziologickém hladovém stavu. Z tohoto hlediska nelze proto považovat redox poměr PN v izolovaných mitochondriích za objektivní měřítko jejich funkční integrity a rovněž nelze podle našeho názoru tímto způsobem sledovat funkční změny v těchto částicích po ozáření ve stavu 1 podle Chance (Chance, B., Williams, G. R., 1955). Proto jsme se pokusili v této práci zachytit funkční stav mitochondriální částice a současně touto technikou sledovat změny vyvolané ionizujícím zářením.

MATERIÁL A METODIKA

Radiochemický účinek záření *in vitro* na redukované a oxydované PN byl sledován v tomto systému: NAD 3,6.10⁻⁴M (Boehringer, Mannheim) v 0,5 M TRIS ústoji, pH 8,2. Roztok byl probublán dusíkem a evakuován v Thunbergově trubici a přímo v této trubici ozářen. Vliv donátoru protonů na redukci NAD zářením byl sledován za stejných podmínek s tím rozdílem, že bylo přidáno 0,1 ml C₂H₅OH na 5 ml roztoku NAD. NADH₂ bylo použito v koncentraci 10⁻³M (Boehringer, Mannheim) v 0, M TRIS ústoji, pH 8,2. Ozařování prováděno aerobně v Thunbergových trubicích.

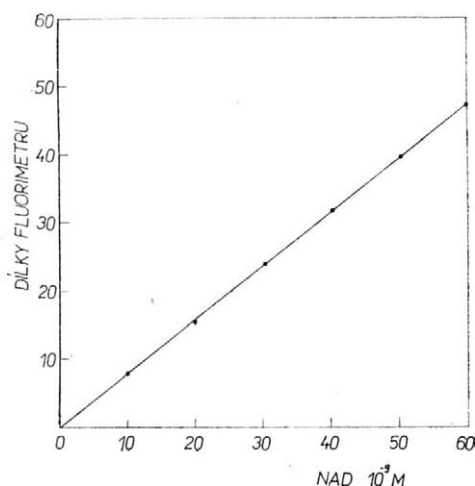
Podmínky ozáření *in vitro*: Makrophos 250, 235 kV, 14 mA, 0,5 mm Cu, 1,0 mm Al, příliv 150 r/min. Celková dávka 42 000 r.

Měření UV absorpce bylo provedeno v oblasti 220–400 nm v 1 cm kyvetách Helma QH na spektrofotometru CF 4 DB Optica. Fluorescenční nativní spektrum bylo vyvoláno vlnovou délkou 365 nm a automaticky registrováno na spektrofotometru CF 4 DB Optica za použití spektrofluorescenčního nástavce a hodnoceno v oblasti 310–600 nm v 1 cm Helma QH kyvetách.

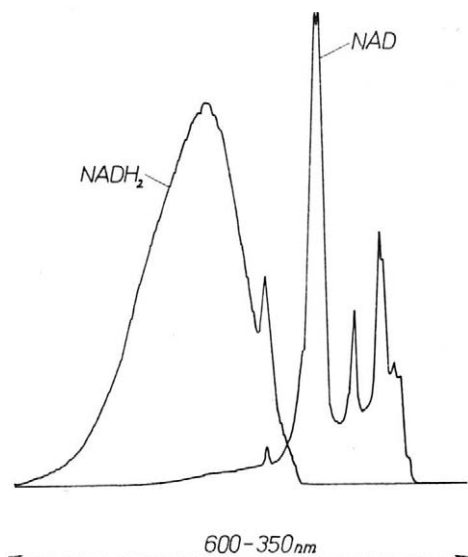
K pokusu *in vitro* jsme použili krysy kmene Wistar, samce váhy 160–180 g. Zvířata byla krmena Larsenovou dietou a dostávala vodu *ad libitum*, před vlastním pokusem zvířata 24 hodin hladověla. Podmínky ozáření: Makrophos 250, 235 kV, 14 mA, 0,5 mm Cu, 1,0 mm Al, příliv 70 r/min., celková dávka 1400 r. Kontrola dávky byla prováděna Mekapionem. Vzorky tkáně byly odebírány frier stop metodou (Hohorst, H. J., Kreutz, F. H., Bücher, Th., 1959 -- Zicha, B., Dienstbier, Z., Borová, J., Beneš, J., Neuwirth, J., 1965), při preparaci mitochondriálních částic jsme vyšli z metody Halla (Hall, J. C., Sordahl, L. A., Stefkó, P. L., 1960). Kontrola čistoty mitochondriální suspenze byla sledována mikroskopicky pod lázovým kontrastem. Extrakce PN z jaterní tkáně byla prováděna metodou podle Basshama (Bassham, J. A., Birt, L. M., Hems, R., Loening, U., 1959), z mitochondrií podle

Klingenberga (Klingerberg, M., 1962). Do jednotlivých funkčních stavů podle Chance (Chance, B., Williams, G. R., 1955) byly mitochondriální částice převáděny podle Klingenberga a Slenczky (Klingerberg, M., Slenczky, W., 1959). Vlastní analytické stanovení PN bylo prováděno fluorimetrickou metodou podle Basshama (Bassham, J. A., Birt, L. M., Hems, R., 1959) s tím, že objemové poměry byly upraveny pro použití fluorimetru Hilger, primární filtr Woods-glass H 566, neutrální filtr H 508, sekundární filtr Wratten 47 (H 600) a vestavěný Wratten 2 B. Měření bylo provedeno proti standardnímu roztoku chinin sulfátu, koncentrace 0,1 mg na 1 litr 0,1 N H_2SO_4 .

Kalibrace přístroje byla provedena na standard NAD (Boehringer, Mannheim), m. v. 663,3, čistota 90,6 % po korekci na 100 %. Kalibrační křivka je uvedena na grafu 1.



Graf 1: Kalibrační křivka pro NAD



Graf 2: Fluorescenční spektrum NAD a $NADH_2$

Bílkoviny v mitochondriální suspenzi byly zjišťovány metodou podle Lowryho (Lowry, H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., 1951) s Folinovým reagens.

Statistické hodnocení výsledků bylo prováděno Studentovým *t* testem.

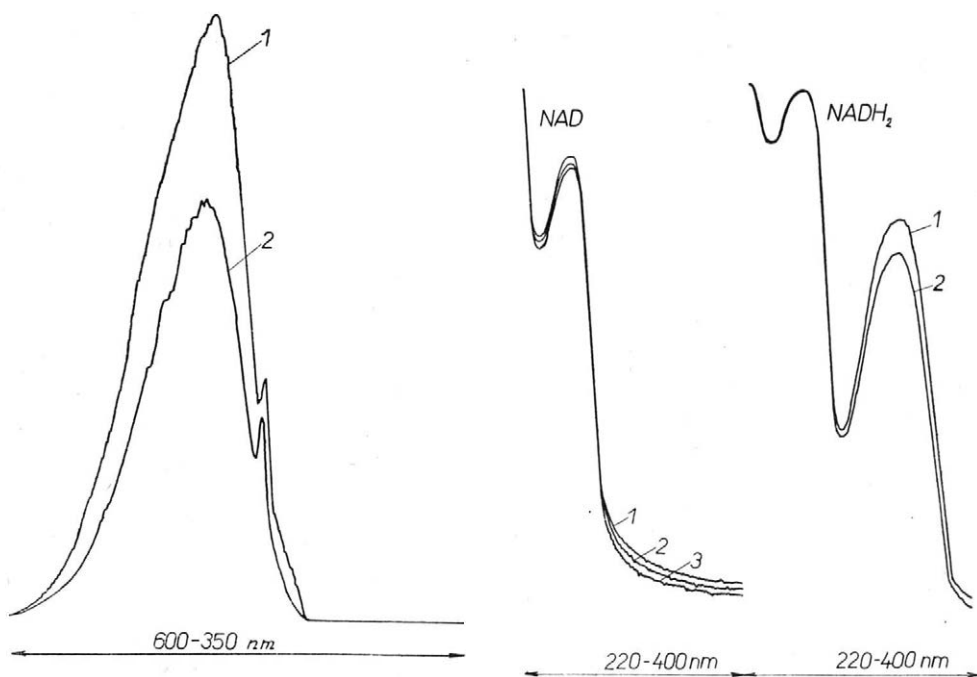
EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

V prvé části práce jsme sledovali radiosenzitivitu PN *in vitro*. Provedli jsme ozáření roztoku NAD a $NADH_2$ v anaerobních a aerobních podmínkách dávkou 42 000 r a sledovali jsme změny v UV spektru a spektrální rozložení indukované fluorescence, buzené 365 nm. Redukovaný a oxydovaný NAD vykazují charakteristická fluorescenční spektra, jak jsou uvedena na grafu 2.

Po ozáření se sice v případě $NADH_2$ snižuje intenzita fluorescence (graf 3), v žádném případě však není dokazatelná fluorescence, které by odpovídala NAD, což vyplývá z porovnání grafu 2 a 3. Vliv záření za těchto podmínek pokusu

neoxyduje NADH_2 , jak by se podle oxidačního účinku záření předpokládalo, ale rozrušuje molekulu pyridinnukleotidu, jak je patrné z útlumu NADH_2 ve fluorescenčním maximu.

Podle absorpční křivky v UV oblasti nepoškozuje dávka 42 000 r významně charakteristickou absorpci, typickou pro nukleotidy — totiž 260 nm — jak je zřejmé z grafu 4, ale snižuje absorpci při 340 nm. Vliv záření v dávce 42 000 r za anaerobních podmínek nevede ani v přítomnosti $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ jako donátora protonů k redukci NAD, jak dokazuje Barron (Barron, E. S. G., 1957), pokud hodnotíme tento vliv ve fluorescenčním spektru, i když pozorujeme v přítomnosti ethanolu značný útlum nativní fluorescence.



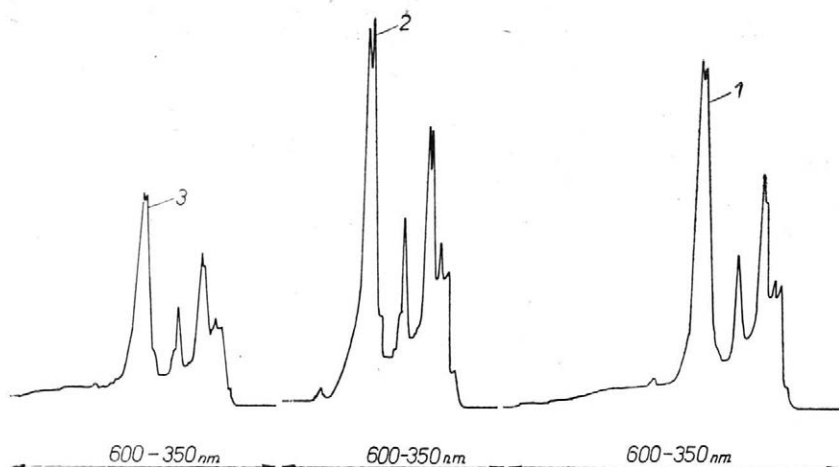
Graf 3: Fluorescenční spektrum NADH_2 po ozáření dávkou 42 000 r (2) ve srovnání s kontrolním vzorkem

Graf 4: Absorpční spektrum NAD
(1) kontrolní vzorek

(2) po dávce 42 000 r (anaerobně + $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)
(3) po dávce 42 000 r (anaerobně)
Absorpční spektrum NADH_2
(1) kontrolní vzorek
(2) po dávce 42 000 r

V pokusu *in vivo* jsme dosahovali průměrných hodnot v jaterní tkáni u skupiny kontrolních krys pro redukované PN 711 nMolů/g vlhké tkáně, pro oxydované PN 360 nMolů/g vlhké tkáně.

Již v intervalu 0 hod. po expozici klesají v naší práci hodnoty PN. Pokles je statisticky významný jak pro oxydované PN, tak pro redukované PN ($p < 0,05$). Maximální pokles je dosažen v intervalu 3 hod. po ozáření ($p < 0,01$) a udržuje se statisticky významně snížený do sledovaného intervalu 24 hod. po ozáření. Tyto změny jsou dobře patrné ve sloupcovitém uspořádání grafu 6.



Graf 5: Fluorescenční spektrum NAD po ozáření 42 000 r v anaerobním prostředí a v přítomnosti C_2H_5OH (3), pouze v anaerobním prostředí (2), ve srovnání s kontrolním vzorkem (1)

Na základě zjištěné poruchy a poklesu PN v játrech po celkovém ozáření dávkou 1400 r jsme považovali za vhodné prošetřit hladiny těchto koenzymů v izolovaných mitochondriích a sledovat vliv záření na funkční stav těchto částic.

Funkční stav mitochondrie v závislosti na koncentraci kyslíku, akceptoru, fosforu a substrátu propracoval Chance (Chance, B., Williams, G. R., 1955). Podle tohoto autora lze funkce mitochondriální částice rozdělit zhruba do 5 stavů, jak je uvedeno v tabulce I. Izolovaná mitochondrie je ve stavu 1 cha-

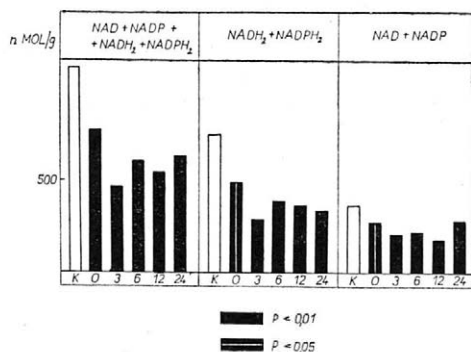
I. Funkční stavy mitochondriální částice podle Chance

Charakteristika	Stav 1	Stav 2	Stav 3	Stav 4	Stav 5
Hladina ADP	nízká	vysoká	vysoká	nízká	vysoká
Hladina substrátu	nízká endog.	0	vysoká	vysoká	vysoká
respirace	pomalá	pomalá	rychlá	pomalá	nulová
Limit. faktor	P akceptor	substrát	respir. řetězec	P. akceptor	kyslík

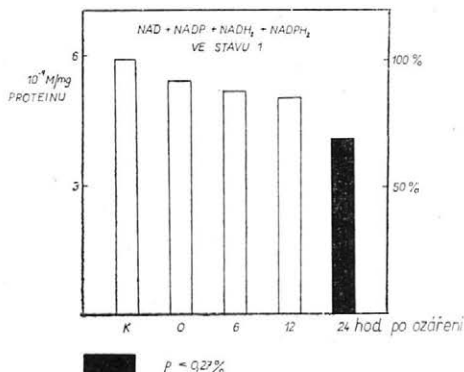
rakterizována nedostatkem kyslíku, nízkou endogenní koncentrací substrátu, jakož i endogenního fosfátového akceptoru, takže je prakticky v hladovém stavu a redox poměr elektronových přenašečů se nutně upravuje podle tohoto stavu, tzn., že se zvýší poměr ve prospěch oxydovaných PN. Mitochondriální částice si zachovává svou funkční aktivitu ve stavu 1 i při teplotě kolem 4 °C pouze po omezenou dobu. Je-li mitochondriální částice ve stavu 1 inkubována při teplotě 25 °C nebo vyšší, dochází rychle k poklesu redukovaných PN. Inkubace po dobu 10 minut při teplotě 37 °C vede k totálnímu vymizení redukovaných PN. Naše sledování

II. Vliv teploty při 25 °C v různých časových intervalech na hodnoty oxydovaných a redukovaných pyridinnukleotidů

Doba inkubace v min.	NAD + NADP v %	NADH ₂ + NADPH ₂ v %	Totální PN v %
0	100	100	100
1,5	75	76,5	75,5
6,5	72	65,5	70
8,0	61,6	62	6 ,3
10	60,4	56	59,2
20	59,6	52,8	57,7



Graf 6: Vliv ionizujícího záření na hodnoty redukovaných a oxydovaných pyridinnukleotidů v játrech krysy po celkovém ozáření dávkou 1400 r.



Graf 7: Totální pyridinnukleotidy v mitochondriích z kryších jater po celkovém ozáření dávkou 1400 r ve stavu 1 podle Chance

závislosti doby teploty při 25 °C na hladiny oxydovaných a redukovaných PN jsou shrnuty v tabulce II.

Z uvedených hodnot vyplývá, že již velmi krátkodobá inkubace mitochondrií ve stavu 1 při 25 °C vede za 8 minut, což je doba pro sledování funkční aktivity v našem technickém uspořádání pokusu, k cca 40 % poklesu původních hodnot.

Výchozí hodnoty PN, dobře korelují s literárními údaji (Birt, L. M., Bartley, W., 1960 — Borst, P., Colpa-Boonstra, J. P., 1960 — Chance, B., Williams, G. R., 1955 — Jacobson, K. B., Kaplan, N. O., 1957 — Purvis, J. L., 1958 — Birt, L. M., Bartley, W., 1960 — Klingenberg, M., Slenczka, W., Ritt, E., 1959 — Takahashi, T., Kamyia, T., Sawada, K., Ishizawa, M., 1960 — Glock, G. E., McLean, P., 1956), ve stavu 1. v čerstvě připravených mitochondriích a vliv záření *in vitro* v jednotlivých časových intervalech po expozici jsou uvedeny na grafu 7. Totální množství PN se v mitochondriích standardizovaných na obsah bílkovin snižuje, přičemž snížení má, jak patrné z grafu, progresivní tendenci.

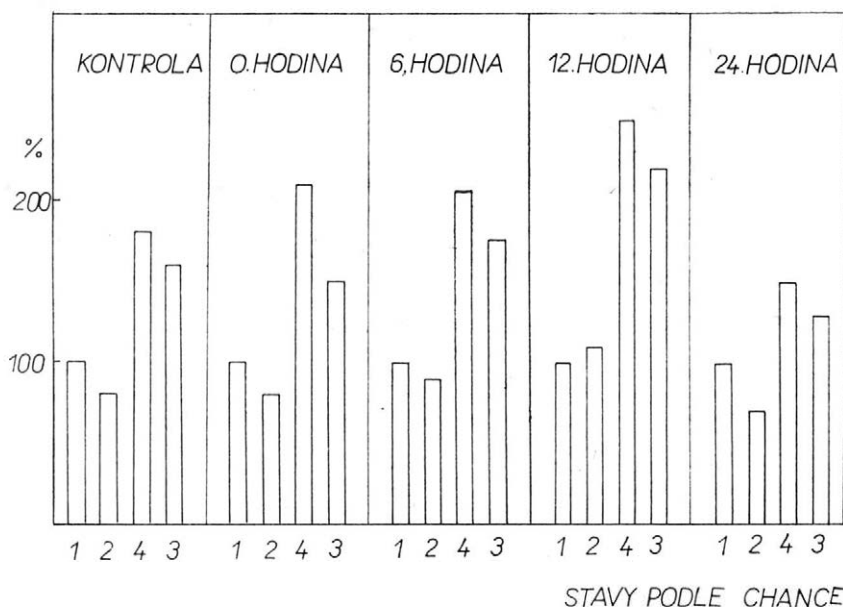
Funkční aktivitu jsme sledovali při teplotě 25 °C a museli jsme předpokládat, že i během celkové inkubace dojde ke snížení totální hodnoty PN. Závislost poklesu totální hodnoty PN během této inkubace je uvedena v tabulce III.

III. Vliv inkubace při 25 °C na hodnoty totálních pyridinnukleotidů ve stavech 2, 4, 3 v relativních % výchozích hodnot

	Čas v minutách				Počet zvířat (n)
	0	1,5	6,5	8	
Kontroly	100	83	85	86	8
0 hod.	100	95	99	81	6
6 hod.	100	92	89,3	84	6
12 hod.	100	86,3	75,4	72,7	8
24 hod.	100	99	89	83,4	6

Již během 8 minutové inkubace mitochondriální suspenze, obohacené fosfátovým akceptorem a donátorem protonů, dochází k cca 15% poklesu totální hodnoty PN v mitochondriích. U ozářených zvířat je tato deplece nejvýraznější 12 hodin po expozici, kdy dosahuje cca 25 %.

V další části pokusu jsme proto prošetřili funkční aktivitu mitochondrií kontrolních a ozářených krys. U kontrolní skupiny ve všech případech po přidání ADP nastává pokles redukované formy PN, odpovídající jejich převedení do stavu 2. Následné přidání kyseliny β -hydroxymáselné vede ke zvýšení redukované formy, odpovídající kontrolovanému stavu 4. Opětovné přidání ADP jako fosfátového akceptoru vede znovu k poklesu redukovaných PN. Považovali jsme tuto schopnost mitochondriální částice, tj. redukovat a oxydovat PN podle toho, jak přechází do jednotlivých funkčních stavů, za měřítko jejich funkční integrity. Vliv záření na tuto funkci ukažuje graf 8.



Graf 8: Vliv radiace na hodnoty pyridinnukleotidů (redukováných) v mitochondriálních částicích ve stavech 1, 2, 4, 3 podle Chance

Je zřejmé, jak to nakonec ukazuje graf, že i ozářená mitochondrie si zachovává schopnost redukovat PN po přidání substrátu jako donátoru vodíku a v přítomnosti akceptoru fosforu. Pouze 12 hodin po ozáření nenastává oxydace PN v nadbytku fosfátového akceptoru.

DISKUSE

Naše výsledky, dosažené v pokusu *in vitro*, nepotvrzují zjištění Barrona (Barron, E. S. G., 1957), protože ani dávkou 42 000 r jsme nedosáhli oxydace NADH_2 a naopak redukce NAD v anaerobním prostředí ani v přítomnosti donátoru protonů. Svědčí to spíše pro nálezy Huga (Hug, O., Schachinger, L. 1959) o možnosti reversibilního poškození NAD a zjištění Adelsteina (Adelstein, S. J., Mee, L. K., 1963), u něhož je tato reversibilita interpretována na NADH_2 s poukazem na možné uplatnění velikosti přílivu radiace. Lze se také přiklonit ke Kühnově názoru o destruktivním účinku ionizujícího záření (Kühn, H., 1963).

Významnost biologické změny v pokusech *in vivo* je zdůrazněna především faktem, že je dosahována na relativně radiorezistentních játrech. Vidíme, že po ozáření supraletální celkovou dávkou 1400 r se významně snižuje obsah totálních PN v jaterní tkáni, avšak nedochází k markantní změně redukčního stupně těchto koenzymů. Redox poměr a redukční stupeň uvádí tabulka IV. Přesto, že po ozáření nastává celkový pokles PN, redukční stupeň je maximální pouze v 15 % v intervalu 3 hod. po expozici a jinak si organismus zachovává redox poměr na stejné úrovni. Zdá se, že pozorovaná změna vyjadřuje spíše poruchu snížené syntézy PN na základě ovlivnění pravděpodobně limitující NAD pyrofosforylázy, jak potvrzují Adelstein a Myers (Adelstein, S. J., Biggs, S. L., 1962 — Myers, N. K., 1962).

IV. Redox poměr a redukční stupeň pyridinnukleotidů v jaterní tkáni krys po celkové expozici dávkou 1400 r

	Redox poměr (%)	Redukční stupeň (%)	n
Kontroly	49,2	66,8	11
0 hod.	60,6	62,0	6
3 hod.	77,7	57,2	12
6 hod.	59,0	63,0	6
12 hod.	49,6	66,7	12
24 hod.	74,6	60,1	6

Podobně jako v jaterní tkáni se snižuje celkový obsah PN vyjádřený na mg bílkovin i v mitochondriálních částicích, ozářených *in vivo*. Je však zajímavým zjištěním, že v intervalu 12 hod. po expozici jsme zjistili maximální hodnoty redukovaných PN ve stavu 4., což by se dalo interpretovat jako snížení oxydativní fosforylace.

Z předběžných výsledků lze vyvodit, že porucha oxydativní fosforylace pozorovaná po ozáření je v respiračním řetězci za stupněm NADH_2 . Ve všech funkčních stavech podle Chance (Chance, B., Williams, G. R., 1955) jsme podobně jako v jaterní tkáni sledovali redukční stupeň. Z výsledků, které shrnuje tabulka V, vyplývá, že ve stavu 1, tj. po izolaci v nedostatku substrátu a akceptoru fosforu, činí podíl redukovaných PN 28 % a po ozáření se vesměs snižuje, vyjma interval 24 hod. po expozici. Má tedy zřejmě izolovaná hladová mitochondrie v ozářeném organismu

V. Vliv ionizujícího záření na hodnoty redukčního stupně pyridinnukleotidů v mitochondriích ve stavech podle Chance

$$\frac{\text{NADH}_2 + \text{NADPH}_2}{\text{NAD} + \text{NADP} + \text{NADH}_2 + \text{NADPH}_2}$$

Funkční stav	Kontrola	0 hod.	6 hod.	12 hod.	24 hod.
Stav 1	0,28	0,201	0,255	0,173	0,286
Stav 2	0,24	0,160	0,240	0,230	0,188
Stav 4	0,57	0,440	0,590	0,570	0,490
Stav 3	0,54	0,370	0,540	0,530	0,470

sníženou hodnotu redukovaných PN. Je ovšem zajímavé, že po podání akceptoru fosforu a substrátu, kyseliny hydroxymáselné, nastává zvýšení hodnot redukovaných PN prakticky jako u kontrolní skupiny. Mitochondrie ozářené *in vivo* neztrácejí tedy svou funkční schopnost redukovat PN, což znovu svědčí pro fakt, že porucha oxydativní fosforylace je lokalizována za blokem přenosu vodíku ze substrátu na PN.

Naše výsledky odpovídají nálezům Lundegardha a spol. (Lundegardh, H., Larkum, A. W. D., 1965), kteří na modelu kvasinek po ozáření rovněž usuzují na přednostní poškození systému předvádějících nebo přeměňujících energii, než přímé poškození a ovlivnění základních elektronových přenosů.

SOUHRN

V práci byl sledován radiochemický účinek záření v dávce 42 000 r *in vitro* na změny NAD a NADH₂ v UV a fluorescenčním spektru. Po dávce 42 000 r se snižuje fluorescence NADH₂ a klesá absorpční maximum při 340 nm, aniž se poruší významně absorpce při 260 nm, odpovídající purinovým bázím adeninu. Nedochází k tvorbě oxydovaného NAD, hodnoceného fluorescenčním spektrem. V anaerobním prostředí a v přítomnosti donátoru protonů se snižuje fluorescenční maximum pro NAD, avšak v žádném případě nelze zjistit redukci. Fluorescenční spektrum NAD v aerobním prostředí prostém donátoru protonů je zcela v souladu s neozářeným NAD. UV spektrum pak prakticky neukazuje významnou změnu v absorpci.

V krysích játrech po celkovém ozáření dávkou 1400 r se snižuje totální množství PN. Ozářená játra jsou však schopna zachovávat normální redukční stupeň v rozmezí 15 % 3 hod. po expozici, kdy jsme zaznamenali největší změnu.

V izolovaných mitochondriích z jater krys po celkovém ozáření dávkou 1400 r se rovněž snižuje totální hladina PN. Hodnocením funkční aktivity takto izolovaných mitochondrií při jejich převedení do stavu 2, 4, 3 podle Chance vyplývá, že ozářená mitochondrie udržuje svoji schopnost přenosu vodíku (protonu) a porucha oxydativní fosforylace je pravděpodobně za stupněm přenosu vodíku z donátoru na NAD.

Došlo dne 3. 5. 1965

Seznam v práci použitých zkratk:

- DNK – kyselina desoxyribonukleová
ADP – adenosin-5-difosfát
NAD – nikotinamid adenin dinukleotid (kozymáza, koenzym I, Co. I, difosfopyridinnukleotid, DNP)
NADP – nikotinamid adenin dinukleotid fosfát (fosfokozymáza, koenzym II, Co. II, trifosfopyridinnukleotid, TPN)
NADH₂ – dihydronikotinamid adenin dinukleotid (redukovaný difosfopyridinnukleotid, DPNH)
NADPH₂ – dihydronikotinamid adenin dinukleotid fosfát (redukovaný trifosfopyridinnukleotid, TPNH)
FAD – flavin adenin dinukleotid

Literatura

1. MICHAELLS, L.: Fundamentals of Oxidation and Reduction. = "Current in Biochemical Research", s. 207, vyd. D. E. Green, Interscience Publish., New York, 1946. – 2. COMMONER, B., LIPPINCOTT, B. B., PASSONEAU, J. V. = "Proc. Natl. Acad. Sci.", 44, 1958, 1099. – 3. BARRON, E. S. G. = "Ann. New York Acad. Sci.", 67, 1957, 648. – 4. HUG, O., SCHACHINGER, L. = "Atomkernenergie", 4, 1959, 290. – 5. ADELSTEIN, S. J., MEE, L. K. = "Biochemistry", 2, 1963, 1294. – 6. KÜHN, H. = "Biophysik", 1, 1963, 189. – 7. EICHEL, H. J., SPIRITES, M. A. = "Proc. Soc. exp. Biol. Med.", 88, 1955, 412. – 8. SONKA, J., HILGERTOVÁ, J., POSPÍŠIL, J., DIENSTBIER, Z. = "Voj. zdrav. listy", 2, 1962, 34. – 9. ALTERBRUNN, H.-J. = "Radiobiol. Radiotherap.", 5, 1964, 77. – 10. RÜTER, J., VACHEK, H., OLDEKOP, M., WÜPPEN, I., HILZ, H. = "Biochem. Z.", 344, 1966, 153. – 11. LISS, E., KLINKE, F., PALME, G. = "Z. Krebsforsch.", 68, 1966, 73. – 12. HORI, K., MOCHIZUKI, S., FUJINO, Y. = "Med. J. Osaka Univ.", 12, 1959, 27. – 13. NOYES, P. P., SMITH, R. E. = "Exp. Cell. Research", 16, 1959, 15. – 14. HALL, J. C., GOLDSTEIN, A. L., SONNEBLICK, B. P. = "J. biol. Chem.", 238, 1963, 1137. – 15. CHANCE, B., WILLIAMS, G. R. = "J. biol. Chem.", 217, 1955, 409. – 16. HOHORST, H. J., KREUTZ, F. H., BÜCHER, Th. = "Biochem. Z.", 332, 1959, 18. – 17. ZÍCHA, B., DIENSTBIER, Z., BOROVÁ, J., BENES, J., NEUWIRTH, J. = "Strahlentherapie", 126, 1965, 299. – 18. HALL, J. C., SORDAHL, L. A., STEFKO, P. L. = "J. biol. Chem.", 235, 1960, 1536. – 19. BASSHAM, J. A., BIRT, L. M., HEMS, R., LEONING, U. = "Biochem. J.", 73, 1959, 491. – 20. KLINGENBERG, M.: Methoden der enzymatischen Analyse. Vyd. H. U. Bergmayer, Verlag Chemie, GmbH Weinheim, Bergstr., 1962, s. 528. – 21. KLINGENBERG, M., SLENCZKA, W. = "Biochem. Z.", 331, 1959, 486. – 22. LOWRY, O. H., ROSNEBROUGH, N. J., FARR, A. L. = "J. biol. Chem.", 193, 1951, 265. – 23. BIRT, L. M., BARTLEY, W. = "Biochem. J.", 75, 1960, 60 P. – 24. BORST, P., COLPA-BOONSTRA, J. P. = "Biochem. J.", 76, 1960, 395. – 25. CHANCE, B., WILLIAMS, G. R. = "J. biol. Chem.", 217, 1955, 395. – 26. JACOBSON, K. B., KAPLAN, N. O. = "J. biol. Chem.", 226, 1957, 603. – 27. PURVIS, J. L. = "Nature", 182, 1958, 711. – 28. BIRT, L. M., BARTLEY, W. = "Biochem. J.", 76, 1960, 328. – 29. KLINGENBERG, M., SLENCZKA, W., RITT, E. = "Biochem. Z.", 331, 1959, 47. – 30. TAKAHASHI, T., KAMYIA, T., SAWADA, K., ISHIZAWA, M. = "Gann Suppl.", 50, 1960, 70. – 31. GLOCK, G. E., MCLEAN, P. = "Expt. Cell Research", 11, 1956, 234. – 32. ADELSTEIN, S. J., BIGGS, S. L. = "Radiation Research", 16, 1962, 422. – 33. MYERS, N. K. = "Can. J. Biochem. Physiol.", 40, 1962, 619. – 34. LUNDEGARDH, H., LARKUM, A. W. D. = "Biochem. biophys. Acta", 97, 1965, 422.

К вопросу нарушения пиридин-нуклеотидов в облученном организме

Изучалось радиохимическое действие облучения в дозе 42 000 r in vitro на изменения NAD и NADH₂ в ультрафиолетовом и флуоресцентном спектре. После дозы 42 000 r снижается флуоресценция NADH₂ и абсорбционный максимум снижается при 340 nm, без значительного нарушения абсорбции при 260 nm, соответствующей пуриновым основаниям аденина. Не происходит образования окисленного NAD, оцениваемого флуоресцентным спектром. В анаэробной среде при наличии донора протонов снижается флуоресцентный

максимум для NAD, однако ни в одном случае нельзя установить редукцию. Флуоресцентный спектр NAD в анаэробной среде без донора протонов полностью согласуется с необлученным NAD, ультрафиолетовый же спектр практически не показывает значительного изменения в абсорбции.

В крысиной печени после облучения всего тела дозой 1400 г снижается общее количество пиридин-нуклеотидов. Облученная печень однако способна сохранить нормальную редукционную степень в пределах 15 % в течение 3 часов после экспозиции, когда было отмечено самое большое изменение.

В изолированных митохондриях из печени крыс после облучения всего тела дозой 1400 г также снижается общий уровень пиридин-нуклеотидов. Из оценки функциональной активности изолированных таким способом митохондрий — при их переведении в положение 2, 4, 3 по Шансе — вытекает, что облученная митохондрия сохраняет свою способность передачи водородного протона, а нарушение окислительной фосфорилиции наступает, вероятно, после передачи водорода с донора на NAD.

Список примененных сокращений

NADPH ₂	— никотинамид аденин динуклеотид (козимаса, коэнзим I., дифосфопиридин нуклеотид, DPN)
NAD	— никотинамид аденин динуклеотид фосфат (козимаса II., коэнзим II., Co. II., трифосфопиридин нуклеотид, TPH)
NADP	— дигидроникотинамид аденин динуклеотид (восстановленный дифосфо-пиридин нуклеотид) (DPNH)
NADH ₂	— дигидроникотинамид аденин динуклеотид фосфат (восстановленный трифосфопиридин нуклеотид, TPNH)
FAD	— флавин аденин динуклеотид
ADP	— кислота дезоксирибонуклеиновая
DNK	— аденосин — 5 — дифосфат

On the Problem of Disturbances of the Pyridine Nucleotides in Irradiated organism

Radiochemical effect of radiation on the changes of NAD and NADH₂ at the dose of 42 000 r was followed in vitro in UV and fluorescence spectrum. Fluorescence of NADH₂ decreases after applying the dose of 42 000 r as well as absorption-maximum at 340 nm; adsorption at 260 nm corresponding to the purine-bases of adenine is not disturbed significantly. Oxydated NAD-production valuated by fluorescence-spectrum does not appear. Fluorescence-maximum for NAD decreases in anaerobic milieu an in presence of donor of protons; reduction, however, cannot be ascertained in any case. Fluorescence-spectrum of NAD in aerobic milieu free from protons-donor entirely coincides with the non-irradiated NAD. The UV spectrum then does not practically show any significant change of absorption.

The total amount of pyridine nucleotides in rat liver decreases after the whole-body irradiation at the dose of 1400 r. The irradiated liver is able, however, to keep the normal reduction degree within the range of 15 % for 3 hours after the exposure, when the greatest change was recorded.

The total level of pyridine nucleotides decreases as well in isolated mitochondriae of rat liver after the whole-body irradiation at the dose of 1400 r. From valuing the functional activity of mitochondriae isolated in such a way, transferring them in the state 2, 4, 3 after Chance, it follows, that an irradiated mitochondria keeps its ability of transferring H-proton; disturbance of the oxydative phosphorylation probably follows the stage of H-transfer from donor to NAD.

List of abbreviations used:

- NAD — nicotinamide adenine dinucleotide (cozymase, coenzyme I.-Co. I., diphosphopyridine nucleotide, DPN)
- NADP — nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (cozymase II., coenzyme II., Co II., triphosphopyridine nucleotide, TPH)
- NADH₂ — dihydronicotinamide adenine dinucleotide (reduced diphosphopyridine nucleotide) (DPNH)

NADPH₂ — dihydronicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced triphosphopyridine nucleotide, TPNH)

FAD — flavine adenine dinucleotide

DNK — (in English DNA) — deoxyribonucleic acid

APD — adenosine-5-diphosphate

Zur Frage der Störung der Pyridin-Nukleotiden im bestrahlten Organismus

Man verfolgte die radiochemische Wirkung der Strahlung von 42 000 r in vitro auf die Änderungen des NAD und NADH₂ im UV- und Fluoreszenz-Spektrum. Nach einer Dosis von 42 000 r senkt sich die Fluoreszenz des NADH₂ und das Absorptions-Maximum bei 340 nm wird herabgesetzt, ohne daß die Absorption bei 260 nm, die den Purin-Basen des Adenins entspricht, signifikant gestört wäre. Es tritt keine Bildung von oxydiertem NAD, das mittels Fluoreszenz-Spektrum bewertet wurde, ein. In anaerobem Milieu und in Anwesenheit des Protonen-Donators wird das Fluoreszenz-Maximum für NAD herabgesetzt; eine Reduktion kann jedoch in keinem Falle ermittelt werden. Das Fluoreszenz-Spektrum NAD in aerobem Milieu, das frei von Protonen-Donator ist, steht vollkommen im Einklang mit unbestrahltem NAD. Das UV-Spektrum zeigt sodann keine signifikante Änderung in der Absorption.

In der Rattenleber wird nach einer Körperbestrahlung in einer Dosis von 1400 r die Gesamtmenge der Pyridin-Nukleotiden herabgesetzt. Die bestrahlte Leber behält jedoch den normalen Reduktionsgrad in einer Spanne von 15 % drei Stunden nach der Exposition, wo wir die höchste Änderung verzeichnet haben.

In isolierten Mitochondrien aus der Leber der Ratten wird nach einer Körperbestrahlung von 1400 r das Gesamtniveau der Pyridin-Nukleotiden ebenfalls herabgesetzt. Aus der Bewertung der Funktionsaktivität der auf diese Weise isolierten Mitochondrien bei ihrer Überführung in den Stand 2,4 3 nach Chance geht hervor, daß die bestrahlte Mitochondrie ihre Fähigkeit der Übertragung von Wasserstoff-Proton behält; die Störung der oxydativen Phosphorylation befindet sich wahrscheinlich hinter dem Grad der Übertragung des Wasserstoffes aus dem Donator auf das NAD.

Abkürzungen:

NAD : Nikotinamid Adenin Dinukleotid (Kozymase, Koenzym I-Co, I. Diphosphoridin Nukleotid, DPN)

NADH₂ : Dihydronicotinamid Adenin Dinukleotid (reduziertes Diphosphopyridin Nukleotid (DPNH))

Podepsáno k tisku 10. 1. 1967

Adresa autorů:

MVDr. Blahoslav Zícha, MVDr. Jiří Beneš, Veterinární výzkumné středisko, Praha-Motol

OBSAH

Dvořák M.: Hladiny sérového cholesterolu u selat ve vztahu ke stáří a k adrenokortikální aktivitě	61
Parráková E., Sečkářová A., Krčméry V.: Vlastnosti enterobaktérií z prostředí zariadení živočišnej výroby — I. citlivosť na tetracyklínové antibiotiká u enteropatogénnych kmeňov Escherichia coli z prostredia veľkochovov v závislosti od používania CTC v krmivách	69
Jiran E., Juračka B., Tokár M.: Ověření imunitačních vlastností inaktivované vakcíny proti infekční hepatitidě psů	73
Černík K., Černíková E.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů viru newcastleské nemoci — II. změny hemaglutinability a infekciozity viru během skladování při různých teplotách	83
Hojovcová M., Pravda D.: Příspěvek ke studiu krevních bílkovin a červené krevní složky při podvýživě skotu v průběhu březosti a krátce po porodu	93
Šlesinger L.: Vliv gravidity na aktivitu některých enzymů (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH) u bilirubinu u krav a novorozených telat	101
Zícha B., Beneš J.: K otázce poruchy pyridinnukleotidů v ozářeném organismu	107

СОДЕРЖАНИЕ

Дворжак М.: Уровни холестерина сыворотки поросят в зависимости от возраста и adrenokortikal'noy aktivnosti (66). — Парракова Е., Сечкарова А., Крчмери В.: Свойства энтеробактерий из среды животноводческих объектов — I. Чувствительность к тетрациклиновым антибиотикам энтеропатогенных штаммов Escherichia coli из среды промышленного разведения в зависимости от применения CTC* в кормах (71). — Йиран Е., Юрачка Б., Токар М.: Проверка иммунизационных свойств инаktivированной вакцины против инфекционного гепатита собак (82). — Черник К., Черникова Е.: Влияние температуры на гемагглютинационную активность и инфекционность некоторых штаммов вируса ньюкастльской болезни — II. Изменения и способность к инфекционности гемагглютинации вируса в течение хранения при разных температурах (91). — Гойовцова М., Правда Д.: К вопросу изучения кровяных белков и красного компонента крови при недостаточном питании крупного рогатого скота в ходе стельности и вскоре после отела (98). — Шлесингр Л.: Влияние беременности на активность некоторых ферментов (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MD) билирубина у коров и у новорожденных телят (105). — Зиха Б., Бенеш Я.: К вопросу нарушения пиридин-нуклеотидов в облученном организме (116).

CONTENT

Dvořák M.: The Serum Cholesterol Level in Piglets in Relation to Age and to the Adrenocortical Activity (67). — Parráková E., Sečkářová A., Krčméry V.: The Characteristics of Enterobacteriaceae of the Environment of Establishments of Livestock Production — I. Sensitiveness to Tetracyclin Antibiotics of Enteropathogenic Strains of Escherichia coli from the Environment of Large Breeding Enterprises in Dependence on the Application of CTC in Feeds (72). — Jiran E., Juračka B., Tokár M.: Checking of the Immunization Properties of Inactivated Vaccine Against Infectious Hepatitis of Dogs (82). — Černík K., Černíková E.: The Influence of Temperature on the Hemagglutination and Infectiousness of the Virus in the Course of Storing at Different Temperatures (91). — Hojovcová M., Pravda D.: On the Study of the Blood Proteins and of the Red Blood Component in Undernourished Cattle in the Course of Pregnancy and Shortly after Parturition (99). — Šlesinger L.: The Influence of Pregnancy on the Activity of some Enzymes (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH) and on Bilirubin in Sows and Newborn Calves (106). — Zícha B., Beneš J.: On the Problem of Disturbances of the Pyridine Nucleotides in Irradiated Organism (118).

INHALT

Dvořák M.: Das Serumcholesterollniveau bei Ferkeln in Beziehung zum Alter und zur adrenokortikalen Aktivität (67). — Parráková E., Sečkářová A., Krčméry V.: Eigenschaften der Enterobakterien aus dem Milieu

der Einrichtungen für tierische Produktion — I. Die Empfindlichkeit gegenüber der Tetrazyklin-Antibiotika bei enteropathogenen Stämmen der *Escherichia coli* aus dem Milieu der Großzucht in Abhängigkeit von der Benützung des CTC in den Futtermitteln (72). — Jiran, E., Juračka B., Tokár M.: Die Überprüfung der Immunisationseigenschaften der inaktivierten Vakzine gegen infektiöse Hepatitis der Hunde (82). — Černík K., Černíková E.: Einfluß der Temperatur auf die Hämagglutinationsfähigkeit und Infektiosität einiger Virusstämme der Newcastlekrankheit — II Veränderungen der Hämagglutinabilität und Infektiosität des Virus während der Lagerung bei verschiedenen Temperaturen (91). — Hojovcová M., Pravda D.: Beitrag zum Studium der Bluteiweißstoffe und der roten Blutkomponente bei der Unternährung des Rindes während der Trächtigkeit und kurz nach dem Abkalben (99). — Šlesinger L.: Einfluß der Gravidität auf die Aktivität einiger Enzyme (GOT, GPT, LAP, ALD, MDH) und Bilirubin bei Kühen und neugeborenen Kälbern (106). — Zícha B., Beneš J.: Zur Frage der Störung der Pyridin-Nukleotiden im bestrahlten Organismus (118).

TABLE DES MATIERES

Dvořák M.: Niveaux de cholestérol sérique des porcelets par rapport à l'âge et à l'activité adrénocorticale (res. An/67, Al/67). — Parráková E., Sečkárová A., Krčméry V.: Propriétés des entérobactéries, provenant du milieu des installations pour la production animale — I. Sensibilité aux antibiotiques tétracycliques des souches entéropathogènes d'*Escherichia coli* du milieu des grands élevages, en fonction de l'emploi de CTC dans les aliments (res. An/72, Al/72). — Jiran E., Juračka B., Tokár M.: Vérification des propriétés immunisantes d'une vaccine inactivée contre l'hépatite infectieuse des chiens (res. An/82, Al/82). — Černík K., Černíková E.: Influence de la température sur l'activité d'hémagglutination et l'infektiosité de certains groupes de virus de la maladie Newcastle — II. Changements d'hémagglutination et d'infektiosité du virus pendant le stockage à des températures différentes (res. An/91, Al/91). — Hojovcová M., Pravda D.: Contribution à l'étude des matières albuminoïdes sanguines et de l'élément rouge de sang en cas de sous-alimentation des bovins au cours de la gestation et bientôt après la mise-bas (res. An/99, Al/99). — Šlesinger L.: Influence de la gravidité sur l'activité de certaines enzymes (GOT, GPT, LAP, ALD, LDH, MDH), de la bilirubine des vaches et des veaux nouveau-nés (res. An/106, Al/106). — Zícha B., Beneš J.: Question relative aux troubles des pyridine-nucléotides dans un organisme irradié (res. An/118, Al/118).