

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

3

ROČNÍK 33 (LVI)
PRAHA
BŘEZEN 1988
CENA 10 Kčs
CS ISSN 0590-5214

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Řídí redakční rada: akademik Jaroslav Otto Vrtiak (předseda), akademik Koloman Boďa, prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., ing. MVDr. Radomír Hromádka, prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc., doc. MVDr. Evžen Jurák, DrSc., MVDr. Jaroslav Palásek, CSc., prof. MVDr. Mikuláš Pješčak, CSc., MVDr. Jozef Sokol, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Za vedení časopisu odpovídá akademik Jaroslav Otto Vrtiak

Redaktorka ing. Jovanka Václavičková

OBSAH

Kmeť V., Koniarová I., Stachová M.: Výskyt a vlastnosti baktérií <i>Selenomonas ruminantium</i> u teliat v období mliečnej výživy	129
Dušinský R., Simon M., Nouzovská D.: Příprava monoklonálních protilátok proti povrchovým antigénom buniek hovädzieho dobytku	135
Rubeš J., Raszyk J., Hořínová Z., Gajdůšková V., Mašek J., Dočekalová H., Bartoš J., Neumannová M.: Monitorování chromozomálních mutací ve velkochovech	143
Kaláb P., Hájek J.: Spolehlivost diagnostiky gravidity u prasnic přímou radioimunoanalýzou estron-sulfátu	151
Molnářová M., Arendarčík J.: Vplyv vitamínu A na trypsin inhibičné aktivity (TIA) krvnej plazmy a cervikálneho hlienu po hormonálnom ovplyvnení ovárií oviec v estricnom období	155
Ruprich J., Piskač A., Malá J.: Použití radioimunologického stanovení mykotoxinu ochratoxin A ke screeningové kontrole potravin a krmiv rostlinného původu — typu obilovin	165
Kredl F., Svobodník J.: Rezidua chlórovaných pesticidů a polychlórovaných bifenylov ve vepřovém mase a šunkách v minulých letech a v současnosti	175
Konrád J., Cupák M., Hrušovský J., Husák S., Šmíd K.: Enzymová aktivita pod vlivem výcvikové zátěže služebního psa	185

СОДЕРЖАНИЕ

Кметь В., Кониарова И., Стахова М.: Появление и свойства <i>Selenomonas ruminantium</i> у телят в период молочного питания	129
Душински Р., Симон М., Ноузовска Д.: Подготовка моноклональных анти-веществ против поверхностным антигенам клеток крупного рогатого скота	135
Рубеш Й., Расзык Й., Горжинова З., Гайдүшкова В., Машек Й., Докекалова Г., Бартош Я., Неуманнова М.: Мониторинг хромосомальных мутаций свиней в крупных животноводческих комплексах	143
Калаб П., Гайек Й.: Надежность диагностики супоросности прямым радиоиммунноанализом эстерон-сульфата	151
Молнарова М., Арендарчик Й.: Влияние витамина А на трипсин ингибирующие активности (TIA) плазмы крови и слизи шейки матки после гормонального влияния на оварию овец в эструсном периоде	155
Руприх Й., Пискач А., Мала Й.: Использование радиоиммунологического установления микотоксина охратоксин А для скринингового контроля продуктов питания и кормов растительного происхождения — типа зерновых	165
Кредл Ф., Свободник Я.: Остатки хлорированных пестицидов и полихлорированных биофенилов в свинине и ветчине за последние годы и в настоящее время	175
Конрад Я., Цупак М., Грушовски Й., Гусак С., Шмид К.: Активность ферментов под влиянием дрессировочной нагрузки служебной собаки	185

VÝSKYT A VLASTNOSTI BAKTÉRIÍ *SELENOMONAS RUMINANTIIUM* U TELIAT V OBDOBÍ MLIEČNEJ VÝŽIVY

V. Kmeť, I. Koniarová, M. Stachová

KMEŤ, V. — KONIAROVÁ, I. — STACHOVÁ, M. (Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice; Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice): *Výskyt a vlastnosti baktérií Selenomonas ruminantium u teliat v období mliečnej výživy*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 129-133.

U teliat v období mliečnej výživy sme sledovali výskyt, morfológické vlastnosti, ureázovú a alfa-amylázovú aktivitu baktérií *Selenomonas ruminantium*. Zistili sme, že priemerný počet selenomonád sa pohyboval v rozmedzí 10^7 až 10^8 baktérií na mililiter bachorového obsahu. Alfa-amylázová aktivita jednotlivých kmeňov bola v rozmedzí od 0,1 do 8,8 nkat.ml⁻¹, zatiaľ čo ureázová aktivita sa pohybovala od 6,3 do 261 nkat.ml⁻¹ živnej pôdy. Elektrónovo-mikroskopickým štúdiom boli zistené morfológicky typické *Selenomonas ruminantium*, ako aj spontánna tvorba sféroplastov.

amylázová a ureázová aktivita; bachorový obsah; sféroplasty

Druh *Selenomonas ruminantium* plní v bachorom ekosystéme celý rad dôležitých funkcií. Je spolu s *Bacteroides amylophilus* a *Succinomonas amylolytica* hlavným zástupcom amylolytických baktérií (Olmeyan a i., 1986). Má 15-krát až 20-krát väčšiu špecifickú ureázovú aktivitu ako zmesná bachorová bakteriálna ureáza (Heusinger, 1986). Hrá dôležitú úlohu pri utilizácii dietetického selénu u prežúvavcov (Hudman a Glenn, 1984) a je producentom kyseliny propiónovej v bachore z karbohydrátov (Scheifinger a Wolin, 1973) a zástupcom bachorových baktérií využívajúcich laktát (Huber a i., 1976). Cieľom našej práce bolo sledovať výskyt a základné vlastnosti baktérií *Selenomonas ruminantium*.

MATERIÁL A METÓDY

Výskyt selenomonád bol sledovaný u teliat v období mliečnej výživy, krmných mliečnou zmesou LAKTAVIT a krmnou zmesou „tvarované krmivo štartérové“. Teliatá boli umiestnené vo veľkokapacitnom teľatníku.

Vzorky bachorového obsahu 18 teliat 35 až 55 dní starých boli odobraté pažerákovou sondou štyri hodiny po rannom nakŕmení. Baktérie druhu *Selenomonas ruminantium* boli izolované na selektívnom agarovom médiu (Tiwarí a i., 1969), ktoré obsahovalo manitol, tryptikázu, kvasničný extrakt, kyselinu n-valérovú a kyselinu octovú, cystein, minerálne a CO₂ fázu.

Alfa-amylázová aktivita (EC 3.2.1.1) bola stanovená pomocou SPOFA-testu alfa-amyláza (Slovakofarma, Hlohovec). Výsledky sú vyjadrené v nanokataloch na mililiter živnej pôdy.

Ureázovú aktivitu (EC 3.5.1.5) sme stanovili modifikovanou spektrofotometrickou metódou (Cook, 1976). Aktivita je vyjadrená v nanokataloch na mililiter živnej pôdy.

Elektrónová mikroskopia, negatívne farbenie: baktérie sme ofarbili 1% fosfowolfrámovou kyselinou (pH 7,2) na pouhlikovaných sieťkach s formvarovou blnou. Preparáty sme vyšetrili na elektrónovom mikroskope TESLA BS 613 pri urýchľovacom napätí 80 kV.

Výsledky sú udané ako aritmetický priemer $\pm$ stredná chyba priemeru.

VÝSLEDKY

Celkové počty baktérií *Selenomonas ruminantium*, získané na selektívnom agarovom médiu, sú znázornené v tab. I. Vzorky bachorového obsahu boli odobraté od teliat rôzneho veku. Celkové počty selenomonád sa pohybovali u jednotlivých zvierat od 8×10^6 do 5×10^8 zárodkov na mililiter bachorového obsahu. Hodnoty enzýmovej aktivity vybraných kmeňov *Selenomonas ruminantium* sú uvedené v tab. II. Priemerná hladina ureázovej aktivity bola 143,59 nkat na mililiter živnej pôdy, pričom kmeň s najnižšou aktivitou mal hodnotu 6,37 nkat . ml⁻¹, zatiaľ čo najvyššia ureázová aktivita mala hodnotu 261,1 nkat . ml⁻¹.

I. Celkové počty *Selenomonas ruminantium* v bachore teliat — Total counts of *Selenomonas ruminantium* in the rumen of calves

Vek v dňoch	1	2	3	4	5	6	LOG 10 $\pm$ $\pm$ S. E. M.
35	5×10^7	3×10^7	1×10^8	6×10^6	3×10^7	8×10^7	$7,88 \pm 0,37$
45	1×10^7	3×10^8	7×10^8	$1,9 \times 10^8$	5×10^8	5×10^8	$8,33 \pm 0,30$
55	$8,5 \times 10^6$	8×10^6	6×10^7	2×10^7	$1,1 \times 10^8$	$1,1 \times 10^7$	$7,33 \pm 0,21$

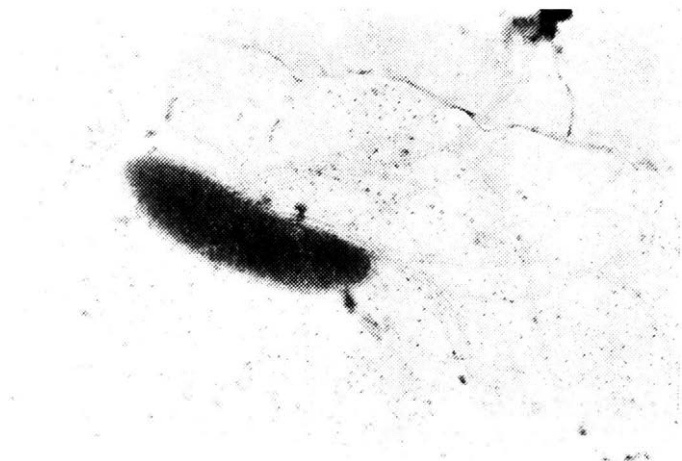
II. Enzýmová aktivita *Selenomonas ruminantium* — Enzyme activity of *Selenomonas ruminantium*

Enzým	Počet kmeňov	Hladina aktivity $\pm$ S. E. M.
Ureáza	30	$143,59 \pm 11,27$ nkat ml ⁻¹
Alfa amyláza	27	$2,17 \pm 0,64$ nkat . ml ⁻¹

Alfa-amylázová aktivita 27 kmeňov kolísala v rozmedzí od 0,1 do 8,8 nkat . ml⁻¹.

Elektrónovomikroskopickým vyšetrením boli zistené morfológicky typické baktérie *Selenomonas ruminantium* (obr. 1). Kmeň č. 72 mal tvar štíhlejšieho, mierne ohnutej tyčinky s dĺžkou 0,6 až 3 μ m a šírkou 0,9 až 1,1 μ m. Na konkávnej strane pozorujeme výrazné husté splete flagel, ktoré sú typické pre selenomonády. Bunková stena má vrstevnaté usporiadanie. Jej morfológicky najnápadnejšou časťou je vonkajšia membrána, ktorá má zreteľný vlnitý charakter. U kmeňa č. 8 sme po 72-hodinovej inkubácii zachytili spontánnu tvorbu sféroplastov, z ktorých do periférie vybiehajú dlhé flagely (obr. 2).

1. Elektrónovomikroskopická fotografia *Selenomonas ruminantium* 72 — Electron microscopic photo of *Selenomonas ruminantium* 72

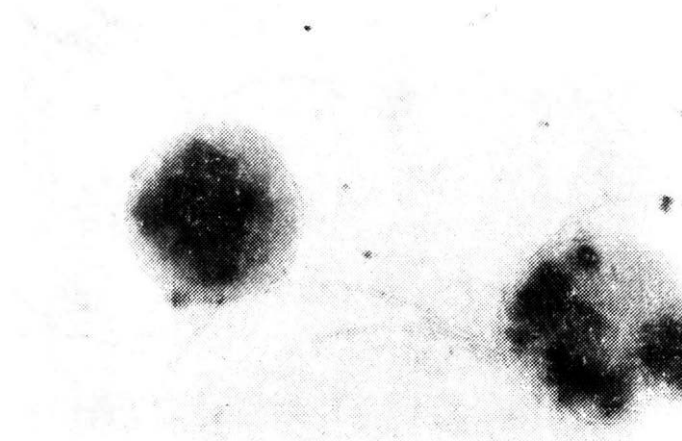


DISKUSIA

Druh *Selenomonas ruminantium* má v bachorovom ekosystéme významné postavenie. Podobne celkové počty selenomonád u teliat v období mliečnej výživy, porovnané k celkovým počtom zárodkov v tomto období, vykazujú niekoľkopercentné zastúpenie. Tieto vlastnosti predurčujú baktérie *Selenomonas ruminantium* ako model bachorovej baktérie pre aplikáciu génových manipulácií. Priemerná hladina ureázovej aktivity 30 testovaných kmeňov selenomonád je dvakrát až štyrikrát väčšia ako celková ureázová aktivita mikroflóry bachorového obsahu teliat (Kmeť a i., 1986), pričom niektoré kmene *Selenomonas ruminantium* dosahujú ureázovú aktivitu osemkrát až desaťkrát vyššiu. Priemerná hladina alfa-amylázovej aktivity u 27 kmeňov je v porovnaní s aktivitou mikroflóry bachorového obsahu teliat nižšia, resp. rovnaká.

Elektrónovomikroskopické štúdium kmeňa *Selenomonas ruminantium* 8 ukázalo na spontánnu tvorbu sféroplastov v selekčnom Tiwariho médiu, ktorá je v súlade s výsledkami autorov Kingsley a Hoeniger [1973]. Táto prirodzená lýza bachorových selenomonád je použiteľná pre prípravu protoplastov ako jedného zo systému prenosu genetického materiálu pri manipuláciách s bachorovými baktériami.

2. Elektrónovomikroskopická fotografia sféroplastov *S. ruminantium* 8 — Electron microscopic photo of the spheroplasts of *S. ruminantium* 8



Literatúra

- COOK, A. R.: Urease activity in the rumen of sheep and the isolation of ureolytic bacteria. J. gen. Microbiol., 92, 1976, s. 32-48.
- HEUSINGER, R. P.: Purification of nickel-containing urease from the rumen anaerobe *Selenomonas ruminantium*. J. biol. Chem., 261, 1986, s. 7866-7870.
- HUBER, T. L. — COOLEY, J. H. — GOETSCH, D. D. — DAS, N. K.: Lactic acid-utilizing bacteria in ruminal fluid of a steer adapted from hay feeding to a high-grain ration. Amer. J. veter. Res., 37, 1976, s. 611-613.
- HUDMAN, J. F. — GLENN, A. R.: Selenite uptake and incorporation by *Selenomonas ruminantium*. Arch. Microbiol., 140, 1984, s. 252-256.
- KINGSLEY, V. V. — HOENIGER, J. F. M.: Growth, structure and classification of *Selenomonas*. Bact. Rev., 37, 1973, s. 479-521.
- KMEŤ, V. — BOŇA, K. — JAVORSKÝ, P. — NEMCOVÁ, R.: The enzymatic activity of rumen microflora in calves. J. anim. Physiol., 56, 1986, s. 73-77.
- OLUMEYAN, D. B. — NAGARAJA, T. G. — MILLER, G. W. — FREY, R. A. — BOYER, J. E.: Rumen microbial changes in cattle fed diets with or without salinomycin. Appl. Envir. Microbiol., 51, 1986, s. 340-345.
- SCHEIFINGER, C. C. — WOLIN, M. J.: Propionate formation from cellulose and soluble sugars by combined cultures of *Bacteroides succinogenes* and *Selenomonas ruminantium*. Appl. Microbiol., 26, 1973, s. 789-795.
- TIWARI, A. D. — BRYANT, M. P. — WOLFE, R. S.: Simple method for isolation of *Selenomonas ruminantium* and some nutritional characteristics of the species. J. Dairy Sci., 52, 1969, s. 2054-2056.

Došlo dňa 6. 4. 1987

KMETĚ, V. — KONIAROVA, I. — STACHOVA, M. (Институт физиологии сельскохозяйственных животных САИ, Кошице; Институт экспериментальной медицины, Кошице): Появление и свойства *Selenomonas ruminantium* у телят в период молочного питания. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 129-133.

У телят в период молочного питания изучали появление, морфологические свойства, уреазную и α -амилазную активность *Selenomonas ruminantium*. Установили, что среднее количество селеномонад колебалось в интервале 10^7 — 10^8 бактерий на миллилитр содержимого рубца α -амилазная активность отдельных штаммов находилась в интервале от 0,1 до 8,8 н кат/мл, хотя уреазная активность находилась в интервале 6,3—261 н кат/мл питательной среды. Электронномикроскопическим изучением были установлены морфологически типичные *Selenomonas ruminantium*, как и спонтанное образование сферопластов.

амилазная и уреазная активность; содержимое рубца; сферопласты

KMETĚ, V. — KONIAROVÁ, I. — STACHOVÁ, M. (Institute of Animal Physiology of the Slovak Academy of Sciences, Košice; Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice): The Occurrence and Properties of *Selenomonas ruminantium* in Calves in the Period of Milk Nutrition. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 129-133.

The occurrence, morphological properties, urease and alpha-amylase activities of *Selenomonas ruminantium* were investigated in calves in the period of milk nutrition. The average number of the organisms was found to range between 10^7 and 10^8 per 1 millilitre of rumen contents. The alpha-amylase activity of the *Selenomonas* strains ranged from 0.1 to 8.8 ncat. ml⁻¹ whereas their urease activity ranged from 6.3 to 261 ncat. ml⁻¹ of nutrient medium. The presence of morphologically typical *Selenomonas ruminantium* and spontaneous formation of spheroplasts were found by electron microscopic examination.

amylase and urease activities; rumen contents; spheroplasts

KMET, V. — KONIAROVÁ, I. — STACHOVÁ, M. (Institut für Physiologie der Nutztiere der Slowakischen Akademie der Wissenschaften, Košice; Institut für experimentelle Veterinärmedizin, Košice): *Vorkommen und Eigenschaften von Selenomonas ruminantium bei Kälbern zur Zeit der Milchernährung*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 129-133.

Wir untersuchten bei Kälbern zur Zeit deren Milchernährung das Vorkommen, die morphologischen Eigenschaften als auch die Urease- und Alpha-Amylase-Aktivität von *Selenomonas ruminantium*. Wir stellten fest, dass die Durchschnittszahl von *Selenomonaden* von 10^7 bis 10^8 Bakterien/ml Panseninhalt schwankte. Die Alpha-Amylase-Aktivität einzelner Stämme schwankte von 0,1 bis 8,8 nkat.ml⁻¹, die Urease-Aktivität von 6,3 bis 261 nkat.ml⁻¹ Nährboden. Beim Studium mittels Elektronenmikroskop stellten wir morphologisch typische *Selenomonas ruminantium*, als auch eine spontane Bildung der Sphäroplaste fest.

Amylase- und Urease-Aktivität; Panseninhalt; Sphäroplaste

Adresa autorov:

MVDr. Vladimír Kmet, CSc., MVDr. Iveta Koniarová, MVDr. Mária Stachová, Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Dukelských hrdinov 1/B, 040 01 Košice

Vybrané nejnovější tituly z oboru veterinární medicína ve fondu ÚZLK

- BOŽKO, G. K.: Orhanizacija protyepizootyčnych zavodiv.
Kyjiv 1987. D 79.659
- Creep Grazing Lambs on Tall Fescue Pastures. Bulletin 695. West
Virginia University.
Morgantown 1987. C 4.152 695
- DANNENBERG, H. D.: Schweinekrankheiten.
Berlin 1986. D 79.183
- EMANUELSON, U.: Genetic studies on the epidemiology of mastitis
in dairy cattle.
Uppsala 1987. D 69.370 73
- Factors Affecting Gain of Beef Bulls Consigned to a Central Test
Station. Bulletin 693. West Virginia University.
Morgantown 1987. C 4.152 693
- Forage and Livestock Budgets Based on Data from the Allegheny
Highlands Project. Circular 139. West Virginia Univ.
Morgantown 1986. C 7.924 139
- FRANGENBERG, J.: Untersuchungen über Schwermetallgehalte (Cd,
Pb, Zn, Cu, Fe, Ca) in Fleisch und Organen von erkrankten Käl-
bern. Innaugural-Dissertation.
Giessen 1986. E 39.500 1116
- GAER, A.: Ein Beitrag zur Bestimmung der Inulin- und PAH-Clearance
bei der Ratte.
Giessen 1987. E 39.500 1090
- GEYER, H. — TAGWERKER: The Pig's Hoof: Its Structure and
Alternations.
Basel 1986. C 30.275
- GUTMANN, B.: Begleitende Laboratoriumsuntersuchungen des Feld-
versuchs zur oralen Immunisierung bei Füchsen gegen Tollwut in
Hessen vom Frühjahr 1983 bis Herbst 1984.
E 39.500 1102

PRÍPRAVA MONOKLONÁLNYCH PROTILÁTOK PROTI POVRCHOVÝM ANTIGÉNOM BUNIEK HOVÄDZIEHO DOBYTKA

R. Dušínský, M. Simon, D. Nouzovská

DUŠINSKÝ, R. — SIMON, M. — NOUZOVSKÁ, D. (Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice, pracovisko Ivanka pri Dunaji; Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV Košice, pracovisko Ivanka pri Dunaji; Ústav zoohygieny a veterinárnej techniky Trnava, pracovisko Ivanka pri Dunaji): *Príprava monoklonálnych protilátok proti povrchovým antigénom buniek hovädzieho dobytku*. Veter. Med. (Praha). 33, 1988 (3) : 135-142.

Myši BALB/c boli trikrát imunizované bovinými lymfocytmi a trombocytmi *in vivo*. Okrem toho boli disociované sleziny myši imunizované bovinými lymfocytmi *in vitro*. Fúziou slezinných buniek s myšimi myelómovými bunkami boli vytvorené hybridómy produkujúce monoklonálne protilátky. Celkom sa uskutočnili štyri fúzie po imunizáciách *in vivo* a tri fúzie po imunizáciách *in vitro*, z ktorých sa získalo 70 stabilných klonov hybridómov. Päť monoklonálnych protilátok sa identicky viazalo špecificky len na boviné trombocyty, dve protilátky reagovali len s určitou populáciou boviných slezinných buniek. Ostatné monoklonálne protilátky nevykazovali tkanivovú špecifickosť a viazali sa na lymfocyty z periférnej krvi, lymfatických uzlín, týmusu a sleziny, na trombocyty, pečenné bunky a spermie, ale nie na erytrocyty. Pokiaľ sa týka množstva získaných hybridómov a špecifických protilátok, podstatný rozdiel v účinnosti imunizácie *in vivo* a *in vitro* nebol pozorovaný.

hybridómy; membránové antigény; imunizácia *in vivo* a *in vitro*; ELISA; nepriama imunofluorescencia

Jedným z perspektívnych smerov biotechnológie je hybridómová technika, umožňujúca prípravu monoklonálnych protilátok (MP), ktoré sa oproti konvenčným protilátkam vyznačujú viacerými výhodnými charakteristikami. Medzi pozoruhodné vlastnosti patrí ich špecifickosť (rozoznávajú jedinú antigennú determinantu na makromolekule antigénu). Protilátky sa získavajú vo vysokých koncentráciách a ich produkcia môže byť neobmedzene dlhá pri zachovaní rovnakých vlastností. Monoklonálne protilátky už v súčasnosti dosiahli široké využitie v biomedicínskom výskume a postupne nachádzajú uplatnenie aj v terapii. Vo veterinárnej medicíne sa pravdepodobne budú monoklonálne protilátky najintenzívnejšie využívať ako diagnostické reagenty na určovanie infekčných agens a klinicky dôležitých látok, napr. hormónov, enzýmov, imunoglobulínov a pod.

Nie menší význam majú monoklonálne protilátky pripravené proti antigénom, ktoré sú na povrchu buniek, ako krvné skupiny, histokompatibilitné (MHC) antigény, diferenciačné znaky charakteristické pre určité tkanivá či populáciu buniek a bunkové receptory.

Pri hovädzom dobytku (HD) sa veľké úsilie sústredilo na tvorbu MP proti erytrocytárnym antigénom. Tucker a i. (1986) popísali stabilné klony hybridómov, ktoré produkovali hemolytické monoklonálne protilátky reagujúce s antigénmi A, B, F, Z a S systému krvných skupín. Boli pripravené MP, ktoré rozpoznávajú diferenciačné znaky na T lymfocytoch (Rossi a i., 1986), ako aj MP reagujúce s markermi B lymfocytov (Lewin a i., 1985). Zaane a Jzerman (1984) vytvorili hybridómy produkujúce protilátky proti niektorým triedam hovädzích imunoglobulínov.

Zatiaľ menej úspešné boli pokusy zamerané na prípravu MP určujúcich polymorfné determinanty hlavného histokompatibilného komplexu hovädzieho dobytku — BoLA (Spooner a Pinder, 1983).

Našou úlohou je pripraviť MP proti MHC a diferenciačným antigénom HD. V tejto práci sú popísané prvé experimenty a predbežné výsledky pri príprave MP proti povrchovým antigénom niektorých krvných elementov a buniek parenchymatóznych orgánov hovädzieho dobytku.

MATERIÁL A METÓDY

V experimentoch bola použitá krv od 24 kusov hovädzieho dobytku slovenského strakatého plemena, križeného s plemenom čiernostrakatým, bez rozdielu pohlavia. Z krvi boli izolované lymfocyty a erytrocyty (Simon a i., 1984), trombocyty boli izolované metódou, ktorú uviedol Taaning (1985), ostatné typy buniek boli získané deštrukciou príslušných tkanív (lymfatické uzliny, slezina, týmus, pečeň, prísemenníky býkov).

PRÍPRAVA HYBRIDÓMOV

Hybridómy boli pripravené fúziou myších myelómových buniek SP2.0 so slezinnými bunkami získanými z imunizovaných myši.

a) Imunizácia bola robená dvoma spôsobmi — *in vivo* a *in vitro*. Pri imunizácii *in vivo* samičky myši BALB/c vo veku dva až päť mesiacov boli trikrát injikované i. p. v 10- až 14-denných intervaloch suspenziou lymfocytov ($5 \cdot 10^7$) a trombocytov ($1 \cdot 10^7$) v 0,9% chloride sodnom. Tretí deň po poslednej imunizácii boli z týchto myši získané slezinne bunky, ktoré boli použité na fúziu. Pri imunizácii *in vitro* slúžili ako antigén lymfocyty HD ($1 \cdot 10^7$) inkubované cez noc v 96% etanole pri teplote 0°C. Po premytí v 0,9% chloride sodnom boli tieto lymfocyty inkubované s bunkami získanými z jednej sleziny neimunizovanej myši BALB/c v kultivačnom médiu RPMI 1640 (ÚSOL Praha), doplnenom 10% fetálnym bovinným sérom (VŠV Brno), týmocytovým kondičným médiom a ďalšími doplnkami (Reading, 1982). Po piatich dňoch inkubácie pri teplote 37°C v humidifikovanej atmosfére vzduchu s 5 až 7% CO₂ boli slezinne bunky použité pre fúziu.

b) Fúzia: Bunky boli zmiešané v počte $1,6 \cdot 10^6$ slezinných a $4 \cdot 10^7$ myelómových buniek pri imunizácii *in vivo* a po $2 \cdot 10^7$ z oboch typov pri imunizácii *in vitro*. Fúzia bola indukovaná 50% roztokom polyetylén glykolu 6000 (Serva) s 5% dimetyl-sulfoxidom (Lane, 1985). Po fúzii boli bunky rozdelené do piatich dosiek s 96 kultivačnými jamkami v médiu RPMI 1640 s 10% fetálnym bovinným sérom a hypoxantínom (10^{-4} mol $\cdot$ l $^{-1}$), tymidínom ($1,6 \cdot 10^{-5}$ mol $\cdot$ l $^{-1}$) a aminopterínom ($4 \cdot 10^{-7}$ mol $\cdot$ l $^{-1}$). Súčasne boli do jamiek nasadené myšie peritoneálne makrofágy ($2 \cdot 10^4$ na jamku), získané výplachom peritoneálnej dutiny. Tieto makrofágy slúžili ako podporná výživová vrstva.

c) Skrining hybridómov: Hybridómy produkujúce želané MP boli vyhľadané testom ELISA na základe pozitívnej reakcie supernatantov, t. j. kultivačného média z príslušných jamiek, s lymfocytmi darcu, ktorý bol použitý na imunizácie.

d) Klonovanie: Hybridómy produkujúce vhodné MP boli klonované limitujúcim riedením (Reading, 1982).

e) Získanie MP: Klony hybridómov boli namnožené kultiváciou *in vitro* v médiu RPMI 1640 s 10% fetálnym bovinným sérom a supernatanty boli použité ako zdroj MP. Koncentrácia Ig a imunoglobulínové triedy neboli stanovené.

TESTY NA DETEKCIU VÁZBY MP S BUNKAMI HOVÄDZIEHO DOBYTKA

Test ELISA bol robený imunoperoxidázovou technikou s použitím monovrstvy buniek v jamkách Terasakiho dosiek (Kennett a i., 1983). Antimýši imunoglobulín bol značený peroxidázou (ÚSOL Praha).

Nepriama imunofluorescencia bola robená dvomi spôsobmi. Trombocyty boli testované v suchých náteroch (Linklater a Imlah, 1974) a lymfocyty v suspenzii (Boucheix a i., 1983). Antimýši imunoglobulín bol značený fluorescein-izotiokyanátom (FITC, ÚSOL Praha). Preparáty boli hodnotené fluorescenčným mikroskopom JENALUMAR (NDR) pri epiiluminácii a zväčšení 500X.

ABSORPČNÉ EXPERIMENTY

Supernatanty v riedení 10^{-2} boli zmiešané v rovnakých objemoch so sedimentom buniek (získaným po centrifugácii) a inkubované dve hodiny pri teplote 37 °C. Tieto supernatanty boli potom spätne testované testom ELISA s bovinými lymfocytmi a trombocytmi. Porovnané boli reakcie absorbovaných a neabsorbovaných MP.

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Uskutočnili sa štyri imunizácie *in vivo* a tri *in vitro*, po ktorých nasledovali fúzie myelómových a slezinných buniek a selekcia hybridómov. Rast hybridómov bolo možné pozorovať v kultivačných jamkách v rozpätí 10 až 28 dní po fúzii. Ako vidieť z tab. I, vzhľadom na celkový počet nasadených jamiek sa dosiahlo pri oboch spôsoboch imunizácie približne rovnaké percento (39 a 42 %) jamiek s narastenými bunkami. Nami získaný počet jamiek obsahujúcich hybridómy je nižší ako popisujú iní autori. Pinder a i. (1980) pri príprave MP proti hovädzím lymfocytom v niektorých experimentoch dosiahli až 98 % jamiek s narastenými bunkami. Podiel jamiek obsahujúcich rastúce hybridómy závisí od viacerých faktorov, ako sú napr. úspešnosť fúzie, riedenie suspenzie buniek po fúzii a kultivačné podmienky. Je zrejmé, že so zvyšujúcim sa počtom jamiek s narastenými bunkami sa zväčšuje možnosť získať hybridómy produkujúce špecifické protilátky, najmä proti slabým imunogénnym antigénom. Na druhej strane však stúpa pravdepodobnosť

I. Frekvencia narastených a produkujúcich kultúr hybridómov pri imunizácii *in vivo* a *in vitro* — The frequency of the developed and producing hybridoma cultures after the *in vivo* and *in vitro* immunization

Imunizácia	Celkový počet jamiek	Jamky s narastenými bunkami o _o		Jamky s protilátkami o _o *)		Stabilné klony
<i>in vivo</i>	1920	806	41,9	64	7,9	42
<i>in vitro</i>	1440	574	39,8	44	7,6	28

*) vypočítané z počtu jamiek s narastenými bunkami

výskytu dvoch alebo viacerých rôznych hybridómov spoločne v jednej jamke, čo často môže viesť k strate hľadaného hybridómu a sťažuje podmienky klonovania. Podľa Poisonovho rozdelenia pri nami dosiahnutej frekvencii 39 % jamiek s narastenými bunkami pripadá priemerne 0,5 hybridómu na jednu jamku, zatiaľ čo pri frekvencii 95 až 98 % je pravdepodobný súčasný výskyt troch až štyroch hybridómov v jednej jamke (Stähli a i., 1983).

Testom ELISA sa ukázalo, že nebol podstatný rozdiel medzi oboma spôsobmi imunizácie pokiaľ ide o počet jamiek s pozitívne reagujúcimi protilátkami (7,9 a 7,6 %), čo naznačuje rovnakú účinnosť oboch spôsobov imunizácie. Podiel hybridómov produkujúcich špecifické protilátky závisí v prevažnej miere od počtu špecificky aktivovaných B-lymfoblastov v slezine a je daný spôsobom imunizácie (Stähli a i., 1983). Vzhľadom na to, že monoklonálne protilátky proti boviným bunkám boli inými autormi zatiaľ získané len po imunizácii *in vivo* (Pinder a i., 1980; Nickerson a i., 1983; Rabinovski a Yang, 1986; Tucker a i., 1986; Rossi a i., 1986), nie je možné jednoznačne rozhodnúť o účinnosti oboch spôsobov imunizácie.

Po klonovaní a ďalších kultiváciách častí hybridómov (35 %) stratila schopnosť tvoriť MP. Podarilo sa získať 42 stabilných klonov hybridómov pri imunizácii *in vivo* a 28 stabilných klonov pri imunizácii *in vitro* (tab. I). Strata produkcie protilátok môže postihnúť až 50 až 70 % pôvodne produkujúcich hybridómov, pravdepodobne v dôsledku strát chromozómov (Goding, 1980).

Reaktivita 70 monoklonálnych protilátok bola študovaná na boviných lymfocytoch, trombocytoch a slezinných bunkách na paneli 24 nepríbuzných zvierat pomocou metódy ELISA. Väčšina protilátok reagovala v tomto teste súčasne s lymfocytmi, trombocytmi a slezinnými bunkami, v žiadnom prípade však nie s erytrocytmi. Jedenásť protilátok,

II. Reaktivita monoklonálnych protilátok s rôznymi typmi buniek v teste ELISA — The reactivity of the monoclonal antibodies with various types of cells in the ELISA test

Protilátky	Trombocyty	Lymfocyty, periférna krv	Slezina	Erytrocyty
1.1	+	—	—	—
2.1	+	—	—	—
3.1	+	—	—	—
4.1	+	—	—	—
5.1	+	—	—	—
4.2	—	+	+	—
9.2	+	+	+	—
20.2	—	+	+	—
6.4	—	+	+	—
2.3	—	—	+	—
8.3	—	—	+	—

+ protilátka reaguje s bunkami

— protilátka nereaguje s bunkami

± slabá reakcia

III. Absorpcie monoklonálních protilátek s různými typy buniek (Supernatanty v riedení 10^{-2} boli zmiešané v rovnakých objemoch so sedimentom buniek a inkubované dve hodiny pri teplote 37°C a potom spätne testované testom ELISA s bovinými lymfocyty a trombocyty. Boli porovnané reakcie absorbovaných a neabsorbovaných supernatantov) — The absorption of monoclonal antibodies with various types of cells (supernatants diluted 10^{-2} were mixed at equal volumes with cell sediments and left to incubate for two hours at the temperature of 37°C ; they were then subjected to ELISA procedure with bovine lymphocytes and thrombocytes. The reactions of the absorbed and non-absorbed supernatants were compared)

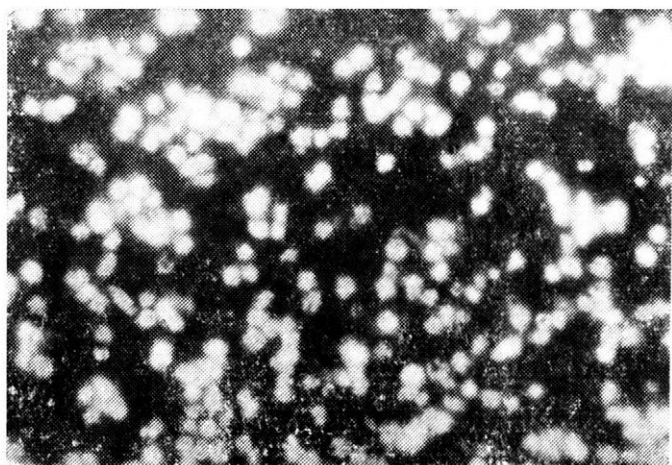
Protílátky	Bunky použité na absorpciu						
	trombocyty	lymfocyty, periférna krv	uzlina	slezina	týmus	pečeň	spermie
1.1	A	N	N	N	N	N	N
2.1	A	N	N	N	N	N	N
3.1	A	N	N	N	N	N	N
4.1	A	N	N	N	N	N	N
5.1	A	N	N	N	N	N	N
4.2	N	A	A	A	A	A	N
9.2	A	A	A	A	A	A	N
20.2	N	A	A	A	A	A	A/N
6.4	N	A	A	A	A	A	N
2.3	N	N	N	A	0	0	0
8.3	N	N	N	A	0	0	0

A — bunky absorbujú danú protílátku
N — bunky neabsorbujú danú protílátku

A/N — slabá absorpcia
0 — netestované

ktoré mali užšiu tkanivovú špecifitu a nereagovali so všetkými typmi buniek, bolo vybraných pre ďalšie analýzy (tab. II). Tieto protílátky boli absorbované rôznymi typmi boviných buniek s cieľom overiť ich tkanivovú špecifitu zistenú na základe priameho testu. Tab. III ukazuje, že protílátky 1.1, 2.1, 3.1, 4.1 a 5.1 (získané z imunizácie *in vivo*) sa v absorpčnom experimente viazali len s trombocyty. Protílátky 2.3 a 8.3 (z imunizácie *in vitro*) boli absorbované len s bunkami sleziny. Ostatné protílátky mali širšiu tkanivovú špecifitu a boli vytvorené po oboch spôsoboch imunizácie.

Ďalej boli monoklonálne protílátky študované v nepriamej imuno fluorescencii na lymfocytoch, trombocytoch a bunkách sleziny. Protílátky 1.1 až 5.1 reagovali špecificky len s trombocyty (obr. 1). Protílátky 2.3 a 8.3 reagovali len s niektorými neidentifikovanými bunkami v slezine (20 % buniek). Pri ostatných protílátkach, ktoré poskytli pozitívne reakcie s lymfocyty v ELISE v priamom teste aj v absorpčných experimentoch, nebolo možné zaznamenať reakciu vo fluorescencii. Absencia fluorescencie by nasvedčovala tomu, že protílátky nereagujú so štruktúrou na povrchu buniek, ale s vnútrobunkovou štruktúrou, prípadne že táto povrchová štruktúra môže byť pri teste ELISA zmenená tak, ako to predpokladajú viacerí autori (Pancake a Nathanson, 1973; Baron a i., 1977; Ewyk a i., 1980). Na druhej strane schop-



1. Reakcia monoklonálnych protilátok s trombocytmí v nepriamej imunofluorescencii —
The reaction of monoclonal antibodies with thrombocytes in indirect immunofluorescence

nosť protilátok viazať sa na natívne bunky pri absorpciách spochybňuje túto možnosť. Okrem toho je známe, že mnohé monoklonálne protilátky produkované hybridómovou technikou majú nízku aviditu (Milstein, 1982). Je preto pravdepodobné, že absencia fluorescence by mohla súvisieť s nízkou aviditou získaných protilátok. Detekované štruktúry na lymfoidných bunkách neboli v tejto práci bližšie definované a nie je známa ani ich distribúcia a hustota na povrchu buniek.

Každá protilátka poskytla reakcie so všetkými testovanými zvieratmi, t. j. neboli pozorované žiadne individuálne rozdiely (polymorfizmus). Tento charakter protilátok poukazuje na to, že rozoznávajú monomorfné determinanty antigénov, ktoré sú prítomné u všetkých jedincov daného druhu. Pre klinickú diagnostiku a štúdium polymorfných systémov by mali väčší význam monoklonálne protilátky rozoznávajúce polymorfné determinanty a diferenciačné znaky na povrchu buniek, ktoré sa získavajú obtiažnejšie ako protilátky popísané v tejto práci. Je pravdepodobné, že vyriešenie otázok vhodnej stimulácie slezinných B-lymfocytov antigénom zvýši pravdepodobnosť získania protilátok proti polymorfným determinantám antigénov.

V našej práci sme zistili rovnakú účinnosť imunizácie *in vivo* a *in vitro*. Metóda *in vitro* má však výhodu kratšej doby imunizácie a vyžaduje menšie množstvo použitého antigénu.

Literatúra

- BARON, D. — WERNET, P. — SCHUNETER, M. D. — WIGZELL, H.: Detection and quantitation of human Ia-type antigens iodinated protein A and specific purification of antibodies against Ia-type alloantigens. *Scand. J. Immunol.*, 6, 1977, s. 385-391.
- BOUCHEIX, C. — PERROT, J. Y. — MIRSHAHI, M. — BERNADOU, A. — ROSENFELD, C.: A rapid method for detection of membrane antigens by immunofluorescence and its application to screening hybridoma antibodies. *J. immunol. Meth.*, 57, 1983, s. 145-150.
- EWYK, W. van — COFFMAN, R. C. — WEISSMAN, I. L.: Immunoelectron microscopy of cell surface antigens: a quantitative analysis of antibody binding after different fixation protocols. *J. Histochem.*, 12, 1980, s. 349.
- GODING, J. W.: Antibody production by hybridomas. *J. immunol. Meth.*, 39, 1980, s. 285-308.
- KENNETT, R. H. — McKEARN, T. J. — BECHTOL, K. B.: Monoclonal antibodies.

- Hybridomas: a new dimension in biological analyses. New York, Plenum 1983, s. 376-377.
- LANE, R. D.: A short-duration polyethylene glycol fusion technique for increasing production of monoclonal antibody-secreting hybridomas. *J. immunol. Meth.*, 81, 1985, s. 223-228.
- LEWIN, H. A. — DAVIS, W. C. — BERNOCO, D.: Monoclonal antibodies that distinguish bovine T and B lymphocytes. *Veter. Immunol. Immunopath.*, 9, 1985, s. 87-102.
- LINKLATER, K. A. — IMLAH, P.: Serological techniques for the detection of antibodies to porcine thrombocytes. I. *Anim. Blood Grps biochem. Genet.*, 5, 1974, s. 29-39.
- MILSTEIN, C.: Monoclonal antibodies from hybrid myelomas. In: *Monoclonal antibodies in clinical medicine*. New York, Acad. Press 1982, s. 3-16.
- NICKERSON, S. C. — SHAPIRO, R. P. — GUIDRY, A. J. — SRIKUMARAN, S. — GOLDSBY, R. A.: Production of monoclonal antibodies to bovine leucocyte cell-surface components. *J. Dairy Sci.*, 66, 1983, s. 1547-1558.
- PANCAKE, S. — NATHANSON, S. G.: Selective loss of H-2 antigenic reactivity after chemical modification. *J. Immunol.*, 111, 1973, s. 1086-1092.
- PINDER, M. — PEARSON, T. W. — ROELANTS, G. E.: The bovine lymphoid system: II. Derivation and partial characterisation of monoclonal antibodies against bovine peripheral blood lymphocytes. *Veter. Immunol. Immunopath.*, 1, 1980, s. 303-316.
- RABINOVSKY, E. D. — YANG, T. J.: Production and characterisation of a bovine T-cell-specific monoclonal antibody identifying a mature differentiation antigens. *J. Immunol.*, 136, 1986, s. 609.
- READING, CH. L.: Theory and methods for immunization in culture and monoclonal production. *J. immunol. Meth.*, 53, 1982, s. 261-291.
- ROSSI, CH. R. — CAMPOS, M. — GHANEKAR, S. V. — PANANGALA, V. S.: A monoclonal antibody that identifies mature T lymphocytes of cattle. *Veter. Immunol. Immunopath.*, 11, 1986, s. 319-324.
- SIMON, M. — ABRHÁMOVÁ, D. — DUŠINSKÝ, R. — BOĎA, K.: Cytotoxické protilátky proti lymfocytárným antigénom hovädzieho dobytku. *Veter. Med. (Praha)*, 29, 1984, s. 449-456.
- SPOONER, R. L. — PINDER, M.: Monoclonal antibodies potentially detecting bovine MHC products. *Veter. Immunol. Immunopath.*, 4, 1983, s. 453-458.
- STÄHLI, C. — STAEHELIN, T. — MIGGIANO, V.: Spleen cell analysis and optimal immunization for high-frequency production of specific hybridomas. In: *Methods in Enzymology*. Vol. 92, Part E, Orlando, USA, Acad. Press 1983, s. 26-36.
- TAANING, E.: Microplate enzyme immunoassay for detection of platelet antibodies. *Tiss. Antigens*, 25, 1985, s. 19-27.
- TUCKER, E. M. — MÉTÉNIER, L. — GROSCLAUDE, J. — CLARKE, S. W. — KILGOUR, L.: Monoclonal antibodies to bovine blood groups antigens. *Anim. Genet.*, 17, 1986, s. 3-13.
- ZAANE, VAN DER — JZERMAN, J.: Monoclonal antibodies against bovine immunoglobulins and their use in isotype-specific ELISA for rotavirus antibody. *J. immunol. Meth.*, 72, 1984, s. 427-441.

Došlo dňa 10. 2. 1987

ДУШИНСКИ, Р. — СИМОН, М. — НОУЗОВСКА, Д. (Институт экспериментальной ветеринарной медицины, Кошице, рабочий пункт Иванка при Дунае; Институт физиологии сельскохозяйственных животных САН Кошице, рабочий пункт Иванка при Дунае; Институт зоогигиены и ветеринарной техники Трнава, рабочий пункт Иванка при Дунае): Подготовка моноклональных антител против поверхностным антигенам клеток крупного рогатого скота. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 135-142.

Мыши БАЛБ с были три раза иммунизированы лимфоцитами и тромбоцитами крупного рогатого скота *in vivo*. Кроме того были диссоциированы селезенки мышей иммунизированных лимфоцитами крупного рогатого скота *in vitro*. Соединением селезеночных клеток с мышьями миеломными клетками были созданы гибридами продуцирующие моноклональные антитела. В общем было сделано четыре соединения после иммунизирования *in vivo* и три соединения после иммунизирования *in vitro*, из которых было получено 70 стабильных клонов гибридомов. Пять моноклональных антител идентично связывалось специфически лишь с тромбоцитами крупного рогатого скота, два антитела реагировали лишь с определенной популяцией селезеночных клеток крупного рогатого скота. У остальных моноклональных антител

не наблюдалась тканевая специфичность и они связывались с лимфоцитами из периферийной крови, лимфатических узлов, вилочковой железы и селезенки, с тромбоцитами печеночной клетки и спермы, но не с эритроцитами. Что касается количества полученных гибридов и специфических антител, существенная разница в действенности иммунизирования *in vivo* и *in vitro* не наблюдалась.

гибридомы; мембранные антигены; иммунизирование *in vitro* и *in vivo*; ЭЛИСА; не-прямая иммунофлюоресценция

DUŠINSKÝ, R. — SIMON, M. — NOUZOVSKÁ, D. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Station Ivanka pri Dunaji; Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice, Station Ivanka pri Dunaji; Institute of Zoohygiene and Veterinary Technology, Trnava, Station Ivanka pri Dunaji): *Preparation of Monoclonal Antibodies to the Surface Antigens of Bovine Cells*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 135-142.

The BALB c mice were immunized three times with bovine lymphocytes and thrombocytes *in vivo*. Besides, dissociated spleens of the mice were immunized with bovine lymphocytes *in vitro*. Hybridomas producing monoclonal antibodies were formed as a result of the fusion of the spleen cells with the murine myeloma cells. On the whole, four fusions were performed after immunization *in vivo* and three fusions after immunization *in vitro*, and 70 stable hybridoma clones were obtained. Five monoclonal antibodies exhibited an identical specific reaction only with bovine thrombocytes, two antibodies reacted only with a certain limited population of bovine spleen cells. The remaining monoclonal antibodies exhibited no tissue specificity and were bound to the lymphocytes of peripheral blood, lymph nodes, thymus, and spleen, to thrombocytes, liver cells, and spermatozoa, but never to erythrocytes. As for the amount of the obtained hybridomas and specific antibodies, no significant difference was observed in the effectiveness of *in vivo* and *in vitro* immunization.

hybridomas; membrane antigens; *in vitro* and *in vivo* immunization; ELISA; indirect immunofluorescence

DUŠINSKÝ, R. — SIMON, M. — NOUZOVSKÁ, D. (Institut für experimentelle Veterinärmedizin, Košice, Arbeitsstätte Ivanka pri Dunaji; Institut für Physiologie landwirtschaftlicher Nutztier der Slowakischen Akademie der Wissenschaften Košice, Arbeitsstätte Ivanka pri Dunaji; Institut für Zoohygiene und Veterinärtechnik Trnava, Arbeitsstätte Ivanka pri Dunaji): *Zubereitung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von Rinderzellen*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 135-142.

BALB c-Mäuse wurden mittels boviner Lymphozyten und Thrombozyten dreimal *in vivo* immunisiert. Daneben wurden dissoziierte Mäusemilzen mittels boviner Lymphozyten *in vitro* immunisiert. Durch Fusion der Milzzellen mit Myelomzellen von Mäusen wurden monoklonale Antikörper bildende Hybridome gebildet. Insgesamt wurden vier Fusionen nach Immunisationen *in vivo* und drei Fusionen nach Immunisationen *in vitro* realisiert, aus denen 70 stabile Hybridomklone gewonnen wurden. Fünf monoklonale Antikörper banden sich identisch spezifisch nur auf bovine Thrombozyten, zwei Antikörper reagierten ausschließlich mit einer bestimmten Population boviner Milzzellen. Die übrigen monoklonalen Antikörper wiesen keine Gewebespezifität auf und banden sich auf Lymphozyten aus peripherem Blut, aus Lymphknoten, dem Thymus und der Milz sowie auf Thrombozyten, Leberzellen und Spermien, jedoch nicht auf Erythrozyten. In bezug auf die Menge der gewonnenen Hybridome und der spezifischen Antikörper wurde kein wesentlicher Unterschied in der Wirksamkeit der Immunisierung *in vivo* und *in vitro* beobachtet.

Hybridome; Membranantigene; Immunisierung *in vivo* und *in vitro*; ELISA; indirekte Immunofluoreszenz

Adresy autorov:

RNDr. Roman Dušinský, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny Košice, pracovisko 900 28 Ivanka pri Dunaji

Ing. Michal Simon, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV Košice, pracovisko 900 28 Ivanka pri Dunaji

MVDr. Dana Nouzovská, Ústav zoohygieny a veterinárskej techniky Trnava, pracovisko 900 28 Ivanka pri Dunaji

MONITOROVÁNÍ CHROMOZOMÁLNÍCH MUTACÍ VE VELKOCHOVECH

J. Rubeš, J. Raszyk, Z. Hořínová, V. Gajdůšková, J. Mašek, H. Dočekalová, J. Bartoš, M. Neumannová

RUBEŠ, J. — RASZYK, J. — HOŘÍNOVÁ, Z. — GAJDŮŠKOVÁ, V. — MASEK, J. — DOČEKALOVÁ, H. — BARTOŠ, J. — NEUMANNOVÁ, M. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno): *Monitorování chromozomálních mutací prasat ve velkochovech*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 143-150.

Studovali jsme frekvenci chromozomálních aberací a výměn sesterských chromatid (SCEs) v periferních lymfocytech 65 prasat chovaných v pěti velkochovech. Čtyři skupiny tvořila výkrmová prasata, jednu skupinu prasnice z rozmnožovacího velkochovu. Ve stájovém prachu byl současně analyzován obsah zinku, olova, kadmia, rtuť, aflatoxinu B₁, PCB, DDT a lindanu. Průměrná frekvence aberantních buněk (AB.B.) u prasat z chovu I činila $3,85 \pm 1,60 \text{ ‰}$, z chovu II $2,10 \pm 1,52 \text{ ‰}$, z chovu III $5,01 \pm 2,1 \text{ ‰}$, z chovu IV $3,50 \pm 1,58 \text{ ‰}$ a z chovu V $6,20 \pm 3,21 \text{ ‰}$. Cytogenetický nálezn odpovídal rozdílům v množství cizorodých látek zjištěných ve stájovém prachu jednotlivých chovů. Průměrná frekvence SCEs byla $7,00 \pm 1,10$; $6,51 \pm 0,89$; $6,92 \pm 0,72$; $7,10 \pm 0,85$ a $7,06 \pm 1,47$ na buňku. Mezi chovy byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v počtu AB.B. mezi chovem II a I, II a IV, I a III, IV a V ($p < 0,05$) a mezi chovy II a III, II a V ($p < 0,01$). Nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl ve frekvenci SCEs. Stanovení frekvence chromozomálních aberací lze užít k hygienické kontrole míry expozice prasat mutageny.

cytogenetické vyšetření: mutagenese; výměny sesterských chromatid; stájový prach; cizorodé látky

Genetické monitorování populací je nutné všude tam, kde je nebezpečí výskytu genotoxických látek v životním nebo pracovním prostředí. K tomuto účelu je využíváno mnoha metod (Hoffmann, 1983; Rubeš, 1986). Nejvyšší výpovědní hodnotu má cytogenetická analýza. Frekvence chromozomálních aberací slouží jako kvantitativní indikátor genetického poškození. Metoda byla přijata jako biologický skupinový expoziční test při hodnocení profesionální expozice mutagenům a karcinogenům (Rössner, 1986).

Cytogenetické vyšetření periferních lymfocytů nemůže určit, které látky a v jakém množství působily na organismus zvířat. Spolehlivě nám však diagnostikuje, byla-li zvířata v období posledních tří až čtyř měsíců exponována cizorodými látkami s mutagenními (resp. klastogenními) vlastnostmi a jak asi silná tato expozice byla. Odráží procesy metabolické aktivace či inaktivace látek v organismu a bere ohled na

kombinované působení látek s potenciací i inhibicí účinků jednotlivých složek. Cytogenetická analýza tedy dává obraz o bezprostředním biologickém účinku konkrétního komplexu mutagenních faktorů určitého mikroklimatu. Z hlediska ochrany zdraví, reprodukčních schopností zvířat a potravního řetězce poskytuje závažnější informace, než je pouhý výčet cizorodých látek v daném prostředí.

Základní informace, kterou je třeba znát, aby mohlo být cytogenetické vyšetření využito pro posouzení hygienické úrovně jednotlivých chovů zvířat, je „spontánní“ úroveň poškození chromozómů — tedy procento aberantních buněk u jednotlivých druhů zvířat za dobrých hygienických podmínek chovu. Dosud nikdo nestanovil vztah mezi cytogenetickým nálezem a obsahem cizorodých látek v prostředí hospodářských zvířat. Ani pro jeden druh hospodářských zvířat nebyla seriózně stanovena hladina chromozomálních aberací za ověřených hygienických podmínek. O získání těchto údajů u prasat jsme se pokusili v této práci.

MATERIÁL A METODY

Vyšetřili jsme pět skupin prasat pocházejících z různých chovů jižní Moravy.

První a pátou skupinu (chov I a V) tvořila výkrmová prasata, trojplemenní kříženci plemen bílé ušlechtilé (BU) × landrase (L) × duroc (D). V obou případech se jednalo o 2000 prasat společně ustájených v moderních bezokenních výkrmových halách s kovovým pláštěm. Větrání bylo zajištěno podtlakovým systémem, krmení a odstraňování exkrementů bylo automatické.

Druhá skupina (chov II) se skládala z výkrmových prasat kříženců BU × PC (přeštické černostrakaté), chovaných v klasické zděné stáji s 250 společně ustájenými prasaty. Ošetřování a krmení prasat je manuální.

Třetí skupinu (chov III) tvořila výkrmová prasata kříženci BU × PC z moderní, automatizované zděné haly o 760 prasatech.

Čtvrtá skupina (chov IV) se skládala z prasnic plemene BU na prvním až třetím vrhu, které byly chovány v rozmnožovacím velkochovu v moderních, automatizovaných zděných halách o 200 až 300 prasnicích.

Ve sledovaných chovech jsou prasata krmena komerčními kompletními krmnými směsmi v suchém stavu. K napájecí vodě z místních zdrojů mají prasata přístup *ad libitum*.

Jeden až dva týdny před plánovanou porážkou byla výkrmovým prasatům odebrána krev k cytogenetickému vyšetření a zároveň byl z výkrmových hal odebrán sedimentovaný prach. V prachu jsme analyzovali zinek, olovo, rtuť, lindan, DDT, aflatoxin B₁ a polychlórované bifenylly (PCB). Analytické postupy všech sledovaných cizorodých látek detailně uvedli Raszyk, Knotek a Gajdůšková aj. (1986a) a Raszyk, Gajdůšková, Mašek aj. (1986b).

Krev byla odebrána od klinicky zdravých zvířat. 1 ml heparinizované krve byl přidán k 8 ml média EPL (ÚSOL, Praha) obsahujícího 20 % telecího séra, fytohemaglutinin H 15 (Wellcome) a bromodeoxyuridin fy Fluka (BrdU) ve finální koncentraci 5 µg na ml. Všechny kultury byly kultivovány při teplotě 38 °C v úplné tmě po 50 hodin. Kolcemid (finální koncentrace 1 µg na ml) byl přidán dvě hodiny před koncem kultivace.

Mikroskopická skla byla připravena air-drying metodou a byla obarvena FPG technikou (Perry a Wolff, 1974). U každého vyšetřeného zvířete byly ve 100 prvních metafázích zjišťovány chromozomální aberace a ve 30 druhých metafázích počítány výměny sesterských chromatid (SCEs).

Při stanovení počtu aberantních buněk nebyly zahrnuty gapy. Za aberantní buňku byla tedy považována buňka nesoucí jeden nebo více zlomů či chromozomálních výměn.

Statistická významnost rozdílů byla hodnocena *t*-testem.

VÝSLEDKY

Průměrná frekvence chromozomálních aberací a výměn sesterských chromatid u prasat z pěti vyšetřených chovů ukazuje tab. II. Z chromozomálních aberací byly zjištěny chromatidové a chromozómové výměny a gapy. Dicentrické a ring chromozómy nebyly zjištěny.

Frekvence aberantních buněk (AB.B.) u prasat v chovu I se pohybovala od 0 do 7 %, s průměrem $3,86 \pm 1,6$ %. U prasat z chovu II se frekvence AB.B. pohybovala od 0 do 5 %, s průměrem $2,1 \pm 1,52$ %. V chovu III jsme našli frekvenci AB.B. v rozsahu 1 až 8 %, s průměrem $5,01 \pm 2,10$ %, v chovu IV v rozsahu 0 až 6 %, s průměrem $3,5 \pm 1,58$ %. Průměrná frekvence AB.B. u prasat v chovu V byla $6,2 \pm 3,21$ %. Dvě prasata v tomto chovu měla více než 10 % AB.B. a nejnižší zjištěný nález byl 3 % AB.B. Chromozómových zlomů zde bylo 14,5 % a u 60 % prasat byly nalezeny chromatidové výměny.

Mezi vyšetřenými chovy byl zjištěn statisticky průkazný rozdíl v počtu AB.B. u prasat, a to mezi chovem II a I, II a IV, I a III, IV a V, kde $p < 0,05$, a mezi chovy II a III, II a V, kde $p < 0,01$.

V množství výměn sesterských chromatid na buňku nebyly mezi vyšetřovanými chovy statisticky průkazné rozdíly.

Ve všech chovech byl stanoven obsah mutagenních látek v sedimentovaném prachu z hal, v nichž byla zvířata chována. Byl sledován aflatoxin B₁, PCB, DDT, lindan, rtuť, olovo, kadmium a zinek (tab. I).

DISKUSE

Porovnáme-li cytogenetické nálezy u prasat (tab. II) s obsahem cizorodých látek v sedimentovaném stájovém prachu (tab. I), můžeme konstatovat, že v chovu II jsou nejvhodnější hygienické podmínky z hle-

I. Obsah vybraných cizorodých látek v sedimentovaném prachu odebraném ve čtyřech výkrmnách prasat (I, II, III, V) a v rozmnožovacím velkochovu prasat (IV) — The content of some foreign substances in the sediments of dust sampled from four pig fattening houses (I, II, III, V) and from the premises of a large multiplier breeding herd of pigs (IV)

Látka (mg. kg ⁻¹)	Chovy				
	I	II	III	IV	V
Zinek (Zn)	499,00	445,00	1405,00	881,00	448,00
Olovo (Pb)	5,98	11,30	173,80	16,00	4,77
Kadmium (Cd)	1,37	0,20	5,30	0,46	1,61
Rtuť (Hg)	0,48	0,13	0,11	0,05	0,36
Lindan	0,0057	0,0135	0,0020	0,0400	0,0058
DDT	0,0020	0,0040	0,0020	0,0051	0,0065
Aflatoxin B ₁	0,0090	0,0081	0,0066	0,0072	0,0129
Polychlorované bifenylly (PCB)	0,1450	0,0800	0,4000	0,0023	1,0000

II. Frekvence chromozomálních aberací a výměn sesterských chromatid ve čtyřech výkrmnách prasat (I, II, III, V) a v rozmnožovacím velkochovu prasat (IV) — The frequency of chromosomal aberrations and exchanges of sister chromatids in four pig fattening houses (I, II, III, V) and on the premises of a large multiplier breeding herd of pigs (IV)

Chovy	Počet vyšetře- ných zvířat	Počet vyšetře- ných buněk	Aberantní buňky (AB.C) ‰	Zlomý chromo- zómů ‰	Chromo- zomální výměny ‰	Počet zlomů na buňku (B/C)	Počet výměn sesterských chromatid na buňku (SCE/C)
I	15	1500	$3,86 \pm 1,60$	4,7	0,40	0,0533	$7,00 \pm 1,10$
II	10	1000	$2,10 \pm 1,52$	3,2	0,40	0,0400	$6,51 \pm 0,89$
III	10	1000	$5,01 \pm 2,10$	6,2	0,60	0,0740	$6,92 \pm 0,72$
IV	15	1500	$3,50 \pm 1,58$	4,9	0,33	0,0553	$7,10 \pm 0,85$
V	15	1500	$6,20 \pm 3,21$	7,4	0,87	0,0913	$7,06 \pm 1,47$

diska výskytu mutagenních látek v prostředí a této situaci odpovídá i nízký cytogenetický nálezní 2,1 % aberantních buněk (AB.B.). Ten se velmi přibližuje nálezům v neexponované lidské populaci. Řada zahraničních autorů sice udává „spontánní“ hladinu chromozomálních aberací u lidí kolem 1 % (Ivanov aj., 1978; Evans, 1982; Gundy a Varga, 1983), ale podle údajů hygienické služby je v ČSR u profesionálně neexponované lidské populace výskyt aberantních buněk kolem 2 % (Rössner, 1987).

Z našich výsledků tedy vyplývá, že za dobrých hygienických podmínek lze u prasat očekávat obdobné cytogenetické nálezy jako u neexponované lidské populace. Jsou-li zjištěny vyšší nálezy AB.B., je nutno uvažovat o průniku cizorodých látek do životního prostředí prasat. Znalost určité referenční hodnoty je důležitá zejména proto, že v chovech zvířat je velmi obtížné získat tzv. srovnatelnou kontrolu, jak je to běžné při vyšetření profesionální expozice u lidí.

V sedimentovaném stájovém prachu bylo stanoveno množství kovů (Pb, Cd, Hg a Zn), u nichž byly některými autory prokázány mutagenní účinky, a to zejména na úrovni chromozómů (Hrouda a Rössner, 1982). Hodnocení kombinovaného působení kovů je obtížné. Při synergickém účinku je výsledný efekt často modifikován ve smyslu potenciace nebo inhibice mutagenního účinku. Dochází např. k výrazné potenciaci účinku při kombinovaném působení kadmia, zinku a olova (Rössner, 1980). Tato situace nastala v chovu III a pravděpodobně se uplatňuje na vysokém nálezu chromozomálních poruch.

Jednotlivé chovy se lišily obsahem polychlórovaných bifenyliů (PCB). Chov V má nejvyšší zjištěný nálezní AB.B. (6,2 %) a zároveň významně vyšší obsah PCB v prachu. Má i vyšší obsah aflatoxinu B₁ a DDT než ostatní sledované chovy. Mutagenní aktivita těchto látek je všeobecně známa. Výsledky studií o mutagenní aktivitě PCB nejsou jednotné a liší se podle typu testovaného výrobku a podle počtu i polohy chlórů v molekule bifenyli. U nás zjistili Holá a Landa (1984) i Kalina aj. (1986) zvýšený výskyt chromozomálních aberací u pracovníků dlouhodobě exponovaných při výrobě československého výrobku PCB Delor. Při chronické expozici může být příčinou zvýšení chromozomál-

ních poruch i vznik toxických polychlórovaných dibenzofuranů vlivem hydroxylace a izomerizace PCB (Mc Kinney, 1975). Významná je i schopnost PCB zvyšovat genotoxicitu chemikálií jak přímo působících, tak i prekarcinogenních (Mendoza — Figueroa aj., 1985).

Podle dnes uznávané interpretace cytogenetických nálezů při hodnocení profesionální expozice u lidí bylo možné předpokládat, že v chovech III a V se jedná o vysokou expozici genotoxickým látkám, protože nález AB.B. je vyšší než 4 %. Podle těchto kritérií lze nálezy 2 až 4 % AB.B. považovat pouze za zvýšenou expozici genotoxickým látkám (Šrám aj., 1981; Rössner, 1987). V tomto rozpětí se také nejčastěji vyskytují nálezy u prasat. Mc Fee a Sherrill (1983) vyšetřili dvě skupiny po třech miniprasnicích a zjistili u první 3,4 % a u druhé 2,7 % aberací. Rubeš (1985) zjistil u deseti miniprasat 3,12 % AB.B. V jiné práci vyšetřil též autor 31 prasnic v reprodukčním chovu a našel 3,58 % AB.B. (Rubeš, 1987). Ani v jednom z těchto chovů však nebyl stanoven obsah mutagenů ve stájovém prostředí zvířat. V naší práci jsme zjistili obdobné nálezy v chovu I (3,86 % AB.B.) a v chovu IV (3,5 % AB.B.). V chovu I je nutno upozornit na vyšší výskyt rtuti, která může zvyšovat počet chromozomálních aberací (Hrouda a Rössner, 1982).

O frekvenci výměn sesterských chromatid u prasat je rovněž málo údajů. Bianchi aj. (1977) uvádějí frekvenci SCEs $7,27 \pm 0,307$ na buňku. Mc Fee a Sherrill (1981) zjistili 7,6 SCEs na buňku. Forester a Butler (1982) našli v lymfocytech kontrolní skupiny prasat 0,214 SCEs na chromozóm. Všechny tyto nálezy jsou velmi podobné našim zjištěním. Přestože mezi vyšetřenými populacemi prasat v naší práci je rozdíl v počtu aberantních buněk, nebyl zjištěn signifikantní rozdíl v počtu SCEs. To potvrzuje závěry o účelnosti vyšetřovat pouze chromozomální aberace při monitorování populací s nízkou hladinou chronické expozice (Wolff, 1983). Metoda diferenciálního barvení sesterských chromatid však umožňuje rozlišit první metafáze po stimulaci lymfocytů. To je u hospodářských zvířat, vzhledem ke kinetice buněčných cyklů jejich lymfocytárních kultur, velmi důležité (Leonard aj., 1982).

V naší práci jsme cytogeneticky vyšetřili 65 prasat chovaných v pěti různých stájových prostředích, jejichž hygienickou úroveň jsme se pokusili charakterizovat z hlediska výskytu cizorodých látek ve stájovém prachu. Práce přináší první údaje o vztahu mezi cytogenetickým nálezem a skutečným výskytem mutagenních látek ve stájovém prostředí prasat. Demonstruje použitelnost a citlivost cytogenetického vyšetření jako indikátoru expozice cizorodým látkám a genetického poškození v chovech hospodářských zvířat. Domníváme se, že u prasat chovaných v přijatelných hygienických podmínkách by neměl počet aberantních buněk přesáhnout 3 %. Jestliže je tato hodnota překročena i při opakovaném vyšetření, bylo by vhodné pátrat po zdroji znečištění stájového prostředí mutageny.

Literatura

BIANCHI, N. O. — BIANCHI, M. S. — LEZANA, E. A. — ZABALA-SUAREZ, J. E.: Interspecies variation in the frequency of SCE. In: A. De La CHAPELLE and M. SORSA (Eds.) Chromosomes today. Vol. 6, 1977, Elsevier, Amsterdam, s. 307-314.

- EVANS, H. J.: Chromosomal mutations in human populations. *Cytogenet. Cell Genet.*, 33, 1982, s. 48-56.
- FÖRSTER, M. — BUTLER, I.: Mutagene Effekte des Halothans II. Erhöhung des Schwesterchromatidaustauschrate an *in vitro* behandelten Schweinelymphozyten. *Z. Tierzüchtg. Zücht.-Biol.*, 99, 1982, s. 257-260.
- GUNDY, S. — VARGA, L. P.: Chromosomal aberrations in healthy persons. *Mutat. Res.*, 120, 1983, s. 187-191.
- HOFFMANN, G. R.: Detection of effects of mutagens in human populations. In: HOLLAENDER, A. a kol.: *Chemical mutagens*. 8. díl, 1. vyd. New York, Plenum Press 1983, s. 53.
- HOLÁ, N. — LANDA, K.: Hodnocení genetického rizika profesionální expozice polychlorovaným bifenylům cytogenetickou analýzou. In: 7. Prac. dny Sekce pro mutagenézu zevním prostředím. Českoslov. biol. Spol. CSAV, Brno, 16.—19. 4. 1984.
- HROUDA, M. — RÖSSNER, P.: Genetické efekty kovů. *Biol. Listy*, 47, 1982, s. 1-16.
- IVANOV, B. — PRASKOVA, L. — MILEVA, M. — BULANOVA, M. — GEORGIEVA, I.: Spontaneous chromosomal aberrations levels in human peripheral lymphocytes. *Mutat. Res.*, 52, 1978, s. 421-526.
- KALINA, I. — LICHVÁR, M. — KONEČNÁ, H. a kol.: Frekvence chromozómových aberací a SCE u pracovníků dlouhodobě exponovaných polychlorovaným bifenylem PCB. *Acta hyg., epidem. microbiol.*, 1986, příloha č. 5, s. 22-25.
- LÉONARD, A. — DECAT, G. — FABRY, L.: The lymphocytes of small mammals. A model for research in cytogenetics? *Mutat. Res.*, 95, 1982, s. 31-44.
- MENDOZA-FIGUEROA, T. — LÓPEZ-REVILLA, R. — VILLA-TREVINO, S.: Aroclor 1254 increases the genotoxicity of several carcinogens to liver primary cell cultures. *J. Toxicol. Envir. Hlth*, 15, 1985, s. 245-254.
- McFEE, A. F. — SHERRILL, M. N.: Evidence for spontaneous SCEs in the lymphocytes of large-animal species. *Mammal. Chromos. Newslett.*, 22, 1981, s. 24.
- McFEE, A. F. — SHERRILL, M. N.: Sister-chromatid exchanges induced in swine lymphocytes by chronic oral doses of dimethylbenzanthracene. *Mutat. Res.*, 116, 1983, s. 349-359.
- McKINNEY, J. D.: Toxicology of selected symmetrical hexachlorobiphenyl isomers: correlating biological effects with chemical structure. In: *Proc. nat. Conf. Polychlorinated Biphenyls*. Chicago, 19—21 November, 1975.
- PERRY, P. — WOLFF, S.: Differential staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. *Chromosoma*, 48, 1974, s. 341-353.
- RASZYK, J. — KNOTEK, Z. — GAJDÚŠKOVÁ, V. a kol.: Fyzikální, chemické a biologické vyšetření prachu z velkovýkrmn prasat. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986a, s. 233-244.
- RASZYK, J. — GAJDÚŠKOVÁ, V. — MASEK, J. a kol.: Trendy změn obsahu cizorodých látek v krmných směsích a ve stájovém prachu ve velkochovech prasat. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986b, s. 733-738.
- RÖSSNER, P.: Genetické riziko kovů. In: *Acta hyg., epidem. microbiol.*, 1980, příloha č. 8, s. 50-55.
- RÖSSNER, P.: Pozdní účinky chemických látek. *Acta hyg., epidem. microbiol.*, 1986, příloha č. 5, s. 1-5.
- RÖSSNER, P.: Metodologie cytogenetické analýzy periferních lymfocytů jako biologického expozičního testu. In: *Genotoxicita faktorů životního prostředí*. Praha, 20. 5. 1987.
- RUBEŠ, J.: Chromosome mutations and sister chromatid exchanges in pigs. *Rocz. Nauk. zoot. T.*, 12, 1985, s. 25-32.
- RUBEŠ, J.: Možnosti detekce působení mutagenů na populace zvířat. *Veterinářství*, 36, 1986, s. 355-357.
- RUBEŠ, J.: Chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges in swine. *Mutat. Res.*, 191, 1987, s. 105-109.
- SRÁM, R. — RÖSSNER, P. — ČERNÁ, M. a kol.: Genetické poškození při profesionální expozici mutageny. *Acta hyg., epidem. microbiol.*, 1981, příloha č. 1, 14 s.
- WOLFF, S.: Problems and prospects in the utilization of cytogenetics to estimate exposure at toxic chemical waste dumps. *Envir. Hlth Perspect.*, 48, 1983, s. 25-27.

Došlo dne 17. 6. 1987

РУБЕШ, Й. — РАСЗЫК, Й. — ГОРЖИНОВА, З. — ГАЙДУШКОВА, В. — МАШЕК, Й. — ДОЧЕКАЛОВА, Г. — БАРТОШ, Я. — НЕУМАННОВА, М. (Научно-исследовательский институт ветеринарной медицины, Брно): **Мониторинг хромосомальных мутаций свиней в крупных животноводческих комплексах.** Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 143-150.

Изучалась частота хромосомальных aberrаций и замена сестринских хроматид (SCEs) в периферийных лимфоцитах 65 поросят разводимых в пяти крупных животноводческих комплексах. Четыре группы составляли откормочные свиньи, одну группу свиноматки из крупного животноводческого комплекса для размножения. В пыли свинарника одновременно анализировалось содержание цинка, олова, кадмия, ртути, афлатоксина В₁, PCB, ДДТ и линдана. Средняя частота aberrационных клеток (AB.B.) у свиней из разведения I составляла $3,85 \pm 1,60\%$, из разведения II $2,10 \pm 1,52\%$, из разведения III $5,01 \pm 2,1\%$, из разведения IV $3,50 \pm 1,58\%$ и из разведения V $6,20 \pm 3,21\%$. Результат цитогенетического обследования отвечал различиям во множестве чужеродных веществ, определенных в пыли свинарника отдельных разведений. Средняя частота SCEs составляла $7,00 \pm 1,10$; $6,51 \pm 0,89$; $6,92 \pm 0,72$; $7,10 \pm 0,85$ и $7,06 \pm 1,47$ на клетку. Между разведениями была определена статистически доказуемая разница в количестве AB.B. между разведением II и I, II и IV, I и III, IV и V ($p < 0,05$) и между разведениями II и III, II и V ($p < 0,01$). Не была определена статистически доказуемая разница во частоте SCEs. Определение частоты хромосомальных aberrаций можно использовать для гигиенического контроля меры экспозиции свиней мутагенами.

цитологическое обследование; мутагенез; замена сестринских хроматид; пыль свинарника; чужеродные вещества

RUBEŠ, J. — RASZYK, J. — HOŘÍNOVÁ, Z. — GAJDUŠKOVÁ, V. — MAŠEK, J. — DOČEKALOVÁ, H. — BARTOŠ, J. — NEUMANNOVÁ, M. (Veterinary Research Institute, Brno): **Monitoring the Chromosomal Mutations of Pigs in Large Herds.** Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 143-150.

The frequency of chromosomal aberrations and exchanges of sister chromatids (SCEs) in peripheral lymphocytes was studied in 65 pigs from five large breeding herds. Four groups comprised fattened pigs and the fifth group consisted of sows from a large multiplier breeding herd. During the investigation, the dust from the sties was analyzed for the presence of zinc, lead, cadmium, mercury, aflatoxin B₁, PCB, DDT, and lindane. The average frequency of aberrant cells (AB.B.) in the pigs of group I was $3,85 \pm 1,60\%$, in group II $2,10 \pm 1,52\%$, in group III $5,01 \pm 2,1\%$, in group IV $3,50 \pm 1,58\%$, and in group V $6,20 \pm 3,21\%$. The cytogenetic finding corresponded to the differences in the amount of foreign substances found in the dust on the premises where the animals of all groups were kept. The average frequency of the SCEs was $7,00 \pm 1,10$ (I), $6,51 \pm 0,89$ (II), $6,92 \pm 0,72$ (III), $7,10 \pm 0,85$ (IV) and $7,06 \pm 1,47$ (V) per one cell. Statistically significant differences in the numbers of AB.B. were recorded between groups II and I, II and IV, I and III, IV and V ($p < 0,05$) and between groups II and III, II and V ($p < 0,01$). There was no statistically significant difference in the frequency of SCEs. The determination of the frequency of chromosomal aberrations can be used for the hygienic control of the degree of exposure of pigs to mutagens.

cytogenetic examination; mutagenesis; exchange of sister chromatids; sty dust; foreign substances

RUBEŠ, J. — RASZYK, J. — HOŘÍNOVÁ, Z. — GAJDUŠKOVÁ, V. — MAŠEK, J. — DOČEKALOVÁ, H. — BARTOŠ, J. — NEUMANNOVÁ, M. (Forschungsinstitut für Veterinärmedizin, Brno): **Monitorieren chromosomaler Mutationen der Schweine in Grosszuchten.** Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 143-150.

Wir studierten die Frequenz der chromosomalen Aberrationen und des Austausches der Schwesterchromatiden (SCEs) in den Peripherilymphozyten bei 65 in fünf Grosszuchten gehaltenen Schweinen. Vier Gruppen wurden von Mastschweinen gebildet, eine Gruppe fasste Sauen aus einer Vermehrungsgrosszucht zusammen. Im Stallstaub wurde gleichzeitig der Gehalt an Zink, Blei, Kadmium, Quecksilber, Afla-

toxin B₁, PCB, DDT und Lindan analysiert. Die durchschnittliche Frequenz der aberranten Zellen (A.B.B.) der Schweine aus der Zucht I betrug $3,85 \pm 1,60 \%$, aus der Zucht II $2,10 \pm 1,52 \%$, aus der Zucht III $5,01 \pm 2,1 \%$, aus der Zucht IV $3,50 \pm 1,58 \%$ und aus der Zucht V $6,20 \pm 3,21 \%$. Der zytogenetische Befund entsprach den Unterschieden in der Menge von Fremdstoffen, die im Stallstaub der einzelnen Zuchten ermittelt worden waren. Die durchschnittliche Frequenz von SCEs war $7,00 \pm 1,10$; $6,51 \pm 0,89$; $6,92 \pm 0,72$; $7,10 \pm 0,85$ und $7,06 \pm 1,47$ je Zelle. Zwischen den Zuchten wurde ein statistisch signifikanter Unterschied in der Zahl von A.B.B. zwischen den Zuchten II und I, II und IV, I und III, IV und V ($p < 0,05$) und zwischen den Zuchten II und III, II und V ($p < 0,01$) ermittelt. Es konnte kein statistisch bedeutender Unterschied in der SCEs-Frequenz nachgewiesen werden. Die Ermittlung der Frequenz der chromosomalen Aberrationen kann zur hygienischen Kontrolle der Expositionsstufe der Schweine durch Mutagene herangezogen werden.

zytogenetische Untersuchung; Mutagenese; Austausch von Schwesterchromatiden; Stallstaub; Fremdstoffe

Adresa autorů:

MVDr. Jiří Rubeš, CSc., MVDr. Josef Raszyk, CSc., MVDr. Zuzana Hořínová, ing. Věra Gajdůšková, CSc., RNDr. Josef Mašek, CSc., RNDr. Hana Dočekalová, MVDr. Jaroslav Bartoš, CSc., RNDr. Milada Neumannová, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

SPOLEHLIVOST DIAGNOSTIKY GRAVIDITY U PRASNIC PŘÍMOU RADIOIMUNOANALÝZOU ESTRON-SULFÁTU

P. Kaláb, J. Hájek

KALÁB, P. — HÁJEK, J. (Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno; Okresní veterinární zařízení, Brno-venkov): *Spolehlivost diagnostiky gravidity u prasnic přímou radioimunoanalýzou estron-sulfátu*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 151-154.

V práci je popsána diagnostika gravidity u prasnic radioimunoanalýzou estron-sulfátu v krevním séru přímou metodou bez extrakce vzorku. Bylo zjištěno, že k diagnostice gravidity lze využít období mezi 22. a 30. dnem gravidity. U všech březích prasnic byla koncentrace estron-sulfátu podstatně vyšší než nejvyšší koncentrace u 64 jalových prasnic. Období před 22. dnem a mezi 30. a 40. dnem nelze k diagnostice gravidity stanovením estron-sulfátu využít. Ve většině vzorků z těchto dvou období je koncentrace estron-sulfátu nižší než 4 nmol.l^{-1} .

krevní sérum; přímá metoda diagnostiky bez extrakce vzorku

Blastocysta produkuje značné množství estrogenů (hlavně estronu a estradiolu 17β), které přecházejí do děložní stěny, kde je estradiol převáděn na estron a ten je konjugován na estron-sulfát (Heap aj., 1979). Hattersley aj. (1980) sledovali koncentrace estron-sulfátu u pěti březích prasnic mezi 18. a 37. dnem gravidity. Nejvyšší koncentrace zjistili mezi 26. a 29. dnem, pak klesaly až k bazálním hodnotám. Metodika radioimunoanalýzy se vyvíjela od komplikovaného postupu zahrnujícího extrakci a hydrolýzu vzorku (Hattersley aj., 1980) k přímému stanovení (Saba a Hattersley, 1981; Fránek a Hruška, 1983). Úkolem této práce bylo ověřit vhodnost přímého stanovení k diagnostice gravidity u prasnic.

MATERIÁL A METODA

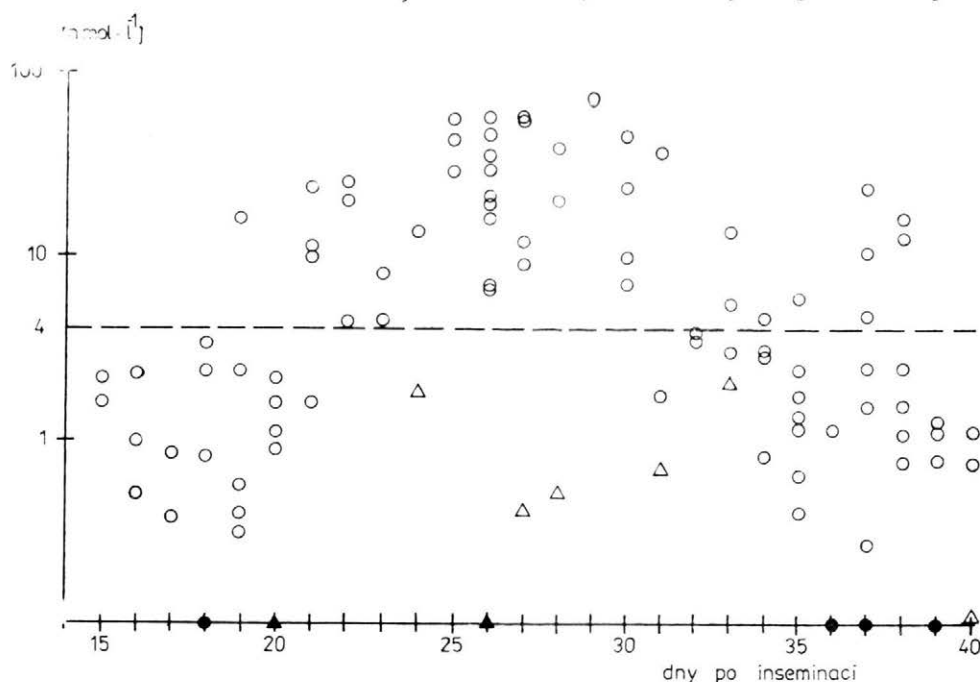
Použili jsme prasnice křížence plemen bílé ušlechtilé a landrase. Estron-sulfát jsme stanovovali v krevním séru radioimunoanalýzou přímou metodou ($20 \mu\text{l}$ séra na zkumavku) se separací vázané a volné aktivity polyetylenglykolem (Apretar, Nováky). Protilátka a značený hormon byly připraveny ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně (Fránek a Hruška, 1983).

Abychom zjistili rozmezí, v jakém se koncentrace estron-sulfátu pohybuje u jalových zvířat, stanovili jsme jej v 57 sérech neinseminovaných jalových prasnic (48 prasnic 1 až 30 dní po porodu a 9 prasnic v říji). Spolehlivost diagnostiky gravidity přímou radioimunoanalýzou jsme ověřovali ve 103 sérech prasnic 15 až 40 dní po inseminaci. Výsledky jsme porovnali se záznamy o porodu (u některých prasnic po inseminaci také s ranou diagnostikou gravidity ultrazvukem 31 dní po inseminaci) a s počtem selat ve vrhu.

V jednom z 57 vzorků odebraných od neinseminovaných jalových prasnic byla falešně vysoká koncentrace estron-sulfátu. Jestliže tento vzorek nezahrneme, pak nejvyšší zjištěná koncentrace estron-sulfátu v sérech 64 jalových prasnic (56 neinseminovaných, 8 inseminovaných a jalových) byla $3,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (průměr $0,59 \pm 0,78$). Výsledky radioimunoanalýzy estron-sulfátu v séru 103 prasnic 15 až 40 dní po inseminaci ukazuje obr. 1. V období od 15. do 21. a od 31. do 40. dne gravidity potvrzené záznamem o porodu byla mezi vzorky z jednoho dne zjištěna vždy alespoň jedna koncentrace nižší než $3,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$, což je ve shodě se zjištěním, které publikovali Hattersley aj. (1980). Proto tohoto období nelze využít. Mezi 22. a 30. dnem byla nejnižší zjištěná koncentrace $4,3 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$ (22. den), což je podstatně vyšší hladina než nejvyšší koncentrace u prasnic jalových ($3,1 \text{ nmol} \cdot \text{l}^{-1}$). Proto považujeme období od 22. do 30. dne po inseminaci za vhodné k diagnostice gravidity přímou radioimunoanalýzou estron-sulfátu. Koncentrace estron-sulfátu z tohoto období nebyly v korelaci s počtem selat ve vrhu.

Hattersley aj. (1980) použili relativně komplikovaný postup extrakce estron-sulfátu a jeho hydrolýzy. Ve srovnání s těmito autory jsme zjišťovali v některých vzorcích několikanásobně vyšší koncentrace, což může být způsobeno nižší specifičností. Správnost diagnostiky gravidity tím není ovlivněna.

Určitou nevýhodou diagnostiky gravidity stanovením estron-sulfátu ve srovnání s ultrazvukem je skutečnost, že zatěžuje organismus pras-



1. Koncentrace estron-sulfátu v séru 103 prasnic 15 až 40 dní po inseminaci (○ březí, △ jalová) — Estrone-sulphate concentrations in the blood serum of 103 sows 15 to 40 days after insemination (○ pregnant sow, △ non-pregnant sow)

nice stresem při odběru krve a že časově zatěžuje také pracovníky, kteří odběr uskutečňují. Mikrokapilární metodu odběru krve (Rodák aj., 1984), která stres nevyvolává a která je používána při detekci protilátek, nelze použít, protože hormonální analýza vyžaduje větší objem vzorku na zkumavku (20 μ l) než infekční diagnostika.

Optimální období pro diagnostiku gravidity stanovením estron-sulfátu je mezi 22. a 30. dnem po inseminaci. Pro posouzení spolehlivosti diagnostiky jsme použili výsledky z tohoto období (39 vzorků) a výsledky u neinseminovaných prasnic (57 vzorků). Spolehlivost březosti (procento porodů ze zjištěných březostí) je 97% (31/32). Jediná falešně březí prasnice byla v skupině neinseminovaných. Spolehlivost jalovosti (procento jalových ze zjištěných jalových) byla 100% (64/64), což je výborný výsledek. Atkinson aj. (1986) uvádějí spolehlivost březosti 94,2% a spolehlivost jalovosti pouze 78%.

Spolehlivost vyšetření ultrazvukem byla nižší i přes malý počet jalových — březost 94% (32/34), jalovost 100% (2/2). Atkinson aj. (1986) také zjistili nižší spolehlivost ultrazvuku — březost 94%, ale jalovost pouze 66%. Závěrem můžeme shrnout, že radioimunoanalýza estron-sulfátu je spolehlivější metoda, ale její nevýhodou ve srovnání s ultrazvukem je nutnost odběru krve.

Literatura

- ATKINSON, S. — BUDDLE, J. R. — WILLIAMSON, P. — HAWKINS, C. D. — WILSON, R. H.: A comparison between plasma oestrone sulphate concentration and doppler ultrasound as methods for pregnancy diagnosis in sows. *Theriogenology*, 26, 1986, s. 483-490.
- FRÁNEK, M. — HRUŠKA, K.: Characterization of antibodies against oestrone-azo-protein conjugates using ^3H and ^{125}I radioligands. *J. steroid. Biochem.*, 19, 1983, s. 1363-1370.
- HATTERSLEY, J. P. — DRANE, H. M. — MATTHEWS, J. G. — WRATHALL, A. E. — SABA, N.: Estimation of estrone sulphate in the serum of pregnant sows. *J. Reprod. Fertil.*, 58, 1980, s. 7-12.
- HEAP, R. B. — FLINT, A. P. — GADSBY, J. E.: Role of embryonic signals in the establishment of pregnancy. *Brit. med. Bull.*, 35, 1979, s. 129-131.
- RODÁK, L. — ŠMÍD, B. — VALÍČEK, L. — JURÁK, E.: Collection of microvolume blood samples into glass capillaries for the detection of antibody against Aujeszky's disease virus in pigs by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and solid-phase radioimmunoassay (RIA). *Acta veter. (Brno)*, 54, 1985, s. 207-216.
- SABA, N. — HATTERSLEY, J. P.: Direct estimation of estrone sulphate in sow serum for a rapid pregnancy diagnosis test. *J. Reprod. Fertil.*, 62, 1981, s. 87-92.

Došlo dne 18. 5. 1987

КАЛАБ, П. — ГАЙЕК, Й. (Научно-исследовательский институт ветеринарной медицины, Брно; Районное ветеринарное отделение, область Брно): Надежность диагностики супоросности прямым радиоиммунноанализом эстерон-сульфата. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 151-154.

В работе описывается диагностика супоросности у свиней радиоиммунноанализом эстерон-сульфата в кровяной сыворотке прямым методом без экстрагирования образца. Было установлено, что для диагностирования супоросности можно использовать период между 22—30-ыми сутками супоросности. У всех супоросных свинок концентрация эстерон-сульфата была значительно выше, чем самая высокая концентрация у 64-ех несупоросных свиноматок. Период до 22-ых и между 30-ыми и 40-ыми сутками

нельзя для диагностирования супоросности, определением эстрон-сульфата использовать. В большинстве образцов из этих двух периодов концентрация эстрон-сульфата является ниже чем 4 нмоль/л.

кровяная сыворотка; прямой метод диагностики без экстрагирования образца

KALÁB, P. — HÁJEK, J. (Veterinary Research Institute, Brno; District Veterinary Station, Brno-venkov): *Reliability of Pregnancy Diagnosis in Sows Using Direct Radioimmunoassay of Estrone-Sulphate*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 151-154.

The pregnancy diagnosis in sows using direct radioimmunoassay of estrone-sulphate in the blood serum without sample extraction is described. It was found that for the pregnancy diagnosis the period between days 22 and 30 of pregnancy can be used since in this period the estrone-sulphate concentrations in all pregnant sows markedly exceeded those of 64 non-pregnant animals. The estrone-sulphate estimation cannot be used for the pregnancy diagnosis before day 22 and between day 30 and 40 because the estrone-sulphate concentrations in most samples collected in these periods were lower than 4 nmol.l⁻¹.

blood serum; direct diagnostic method without sample extraction

KALÁB, P. — HÁJEK, J. (Forschungsinstitute für Veterinärmedizin, Brno; Kreis-veterinäreinrichtung, Brno-Kreis): *Die Trächtigkeitsdiagnostik bei Sauen mittels Radioimmunanalyse des Östronsulfats im Blutserum bei Anwendung der direkten Methode ohne Probenextraktion*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 151-154.

In der vorliegenden Arbeit wird die Trächtigkeitsdiagnostik bei Sauen mittels Radioimmunanalyse des Östronsulfats im Blutserum bei Anwendung der direkten Methode ohne Probenextraktion beschrieben. Zur Trächtigkeitsdiagnostik ist die Zeitspanne zwischen 22. und 30. Trächtigkeitstag geeignet, in der bei allen trächtigen Sauen die Östronsulfatkonzentration wesentlich höher war als die höchste Konzentration bei 64 güsten Sauen. Vor dem 22. Tag und in der Periode zwischen 30. und 40. Tag kann die Trächtigkeit mittels des Östronsulfatnachweises nicht diagnostiziert werden, da in der Mehrzahl der aus diesen zwei Zeitabschnitten stammenden Proben die Östronsulfatkonzentration niedriger als 4 nmol.l⁻¹ ist.

Blutserum; direkte Diagnostikmethode ohne Probenextraktion

Adresy autorů:

MVDr. Pavel Kaláb, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno

MVDr. Jiří Hájek, Veterinární středisko, 665 01 Rosice u Brna, Zámek 1

VPLYV VITAMÍNU A NA TRYPSÍN INHIBIČNÉ AKTIVITY (TIA) KRVNEJ PLAZMY A CERVIKÁLNEHO HLIENU PO HORMONÁLNOM OVPLYVNEŇÍ OVÁRIÍ OVIEC V ESTRICKOM OBDOBÍ

M. Molnárová, J. Arendarčík

MOLNÁROVÁ, M. — ARENDARČÍK, J. (Vysoká škola veterinárska, Košice): *Vplyv vitamínu A na trypsin inhibičné aktivity (TIA) krvnej plazmy a cervikálneho hlienu po hormonálnom ovplyvnení ovárií oviec v estrickom období*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 155-164.

Vplyv vitamínu A (50 000 I. U.) podaného po synchronizácii estru PGF₂alfa (2 × 125 µg; 1. a 11. deň) spolu s PMSG (750 a 1000 I. U.) na zmeny dynamiky trypsin inhibičných aktivít (TIA) krvnej plazmy bol výraznejší ako vplyv PMSG. Tiež priemerné hodnoty TIA počas 120 hodín od podania stimulačnej dávky vykazujú zmeny viac v závislosti od vitamínu A. Po podaní 1000 I. U. PMSG sa zvýšili len hodnoty frakcie nízkomolekulovej TIA, zatiaľ čo po podaní kombinácií PMSG + vitamínu A sa výrazne zvýšili všetky sledované TIA. Toto zvýšenie bolo v priamej korelácii so zvýšeným počtom neatretických terciárnych folikulov, so zvýšeným počtom ovulácií (pri rovnakej dávke PMSG) a zníženým pomerom zmien koncentrácií progesterónu (P) a 17-beta estradiolu (E), $P/E = 1,1$ po 1000 I. U. PMSG, $P/E = 0,81$ po 750 I. U. PMSG + vitamínu A a $P/E = 0,90$ po 1000 I. U. PMSG + vitamínu A. Vzrast priemernej TIA cervikálneho hlienu je spôsobený skôr zvýšenou sekrétnou činnosťou žliaz cervixu ako ich zmnožením po stimulácii ovárií.

synchronizácia; stimulácia; ovária; PGF₂alfa; PMSG; progesterón; 17-beta estradiol; reprodukčné orgány

Účasť proteolytických enzýmov a ich inhibítorov na celom rade enzýmami kontrolovaných fyziologických procesov je známa. Úlohu proteáz pri ruptúre folikulu počas ovulácie opísal Schochet už v roku 1916. Rozličné aspekty účasti proteolytických enzýmov pri ovuláciách opísali Espey (1974, 1980), Ichikawa a i. (1983) a iní. Retinol ovplyvňuje produkciu steroidných hormónov (Bates, 1983). Molekulárne mechanizmy účinku retinolu nie sú doteraz presne známe, ale predpokladá sa, že retinol sa ako koenzým zúčastňuje na syntéze glykoproteínov sprostredkovanej membránou, alebo špecificky reaguje s bunkovým jadrom cez špecifické väzbové proteíny (Omori a Chytil, 1982; Wolf a i., 1983; Chytil, 1984, 1986). Podanie superovulačných dávok PMSG mení bielkovinové zloženie oocyту oviec a spôsobuje nerovnomerný vývoj rôznych „kompartmentov“ folikulu (Moor a i., 1985). Atrézia folikulov je opisovaná ako proces, pri ktorom folikul stráca svoju integritu, ale presný biochemický mechanizmus stále nie je úplne známy. Centola (1982) sa domnieva, že môže ísť o zmeny v mukopolysacharidovom povrchu zóny pellucidy, ktoré sa objavujú počas atré-

zie a sú charakterizované keratinizovanými elementami. Léveillé a i. (1987) zistili zvýšenú fagocytózu zóny pellucidy bunkami granulóz ako následok podania PMSG škrečkom. Úlohu proteáz a ich inhibítorov na ovariálnej úrovni sa pokúšali osvetliť Bagdasarjan a i. (1981). Títo autori zistili, že bunky ovariálnej strómy obsahujú aliaiproteázový inhibítor, ktorý je hlavným sérovým proteázovým inhibítorom. Domnievajú sa, že táto antiproteáza môže byť syntetizovaná bunkami ovariálnej strómy a pripisujú jej regulačnú úlohu pri ovuláciách. Reich a i. (1986) študovali intrafolikulárnu distribúciu plazminogénových aktivátorov a ich hormonálnu reguláciu. Dokázali úlohu plazminogénovej aktivácie kolagenolýzy. Imoedemhe a Shaw (1986) sa domnievajú, že by mala byť venovaná väčšia pozornosť biochemickému mikroprostrediu oocyty ovplyvnenému inými faktormi ako steroidnými. Zmeny proteázových a antiproteázových aktivít v genitálnom trakte počas ovariálneho cyklu sú špecifické fyziologické fenomény smerované k vytváraniu optimálneho prostredia pre uvoľnenie, transport a spojenie gamiet v samičom pohlavnom ústroji. Zníženie alfa antitrypsínových aktivít vo folikulárnej tekutine v čase ovulácie môžu podporovať túto teóriu. Tiež zmeny trypsín inhibičných aktivít cervikálneho hlienu počas menštruačného cyklu (Schumacher a i., 1977), ako aj estrického cyklu spontánneho alebo ovplyvneného podaním superovulačných dávok gonadotropných hormónov (Molnárová, 1975) poukazujú na ich účasť v týchto dejoch.

MATERIÁL A METÓDA

Do pokusu sme zaradili 20 oviec v estrickom období (október—november) plemena slovenské merino, trojročných až štvorročných, ž. h. 30 až 40 kg, klinicky zdravých. Usporiadanie pokusu je na tab. I.

Krv sme odoberali denne ráno o 8.00 hodine, z *v. jugularis* na heparín a krvnú plazmu sme uložili až do spracovania pri teplote -25°C . Cervikálny hlien sme odoberali na vatové tampóny a po zväžení eluovali 0,05 M tris HCl pušrom ($\text{pH} = 8.1$). Trypsín inhibičnú aktivitu (TIA) krvnej plazmy a cervikálneho hlienu sme stanovovali ako je uvedené v našich predchádzajúcich prácach (Molnárová a i., 1987).

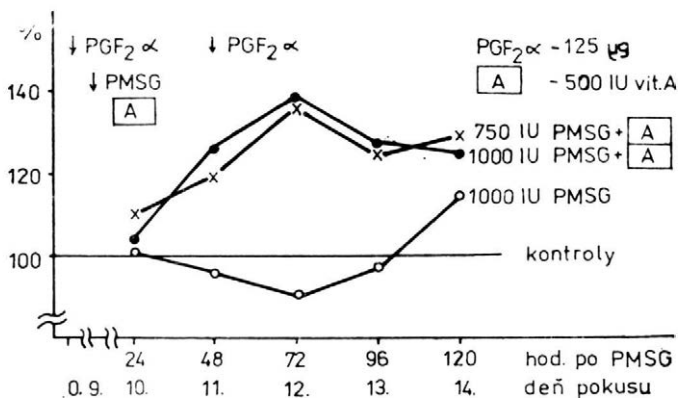
Stanovenia koncentrácií progesterónu a 17-beta estradiolu sme robili metódou RIA pomocou kitov firmy CEA SORIN, Biomedica, Italia, pomocou ^3H zna-

I. Usporiadanie pokusu: synchronizácia $\text{PGF}_2\alpha$, stimulácia PMSG + vitamínom A ovárií oviec v estrickom období (október—november) — Trial arrangement: $\text{PGF}_2\alpha$ synchronization, stimulation with PMSG + vitamin A of the ovaries of ewes in the estrous period (October—November)

Skupina oviec	Počet (n)	$\text{PGF}_2\alpha$ 0. 11. deň (μg)	PMSG 9. deň (I. U.)	Vitamin A 9. deň (I. U.)
I.	5	125 + 125	—	—
II.	5	125 - 125	1000	—
III.	5	125 - 125	750	50 000
IV.	5	125 - 125	1900	50 000

$\text{PGF}_2\alpha$ alfa — Oestrophan, Spofa; PMSG — Antex Leo; Vitamin A — Retinol Spofa, podané i. m.

1. Zmeny dynamiky celkovej trypsin inhibičnej aktivity krvnej plazmy oviec po synchronizácii a stimulácii ovárií v estri (október—november) — Changes in the total trypsin-inhibition activity of the blood plasma of ewes after synchronization and stimulation of the ovaries in oestrus (October—November)



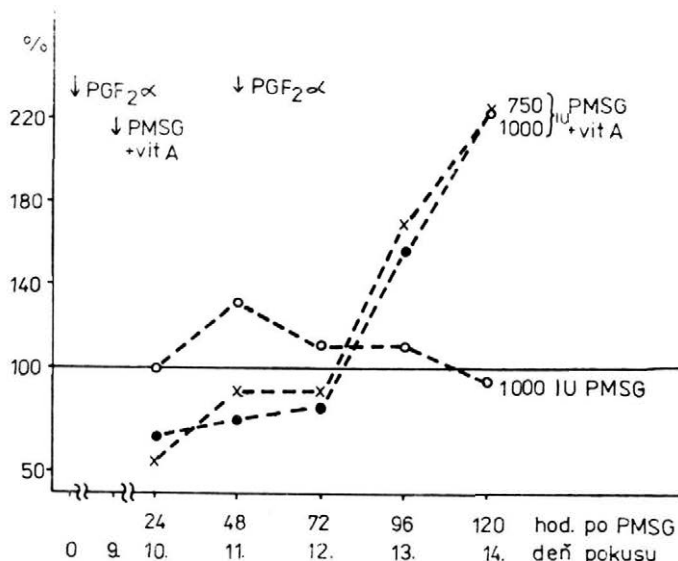
čeného progesterónu a ^3H značeného 17-beta estradiolu a zmeny koncentrácií hormónov sme vyjadrili v percentách hodnôt kontrolných oviec.

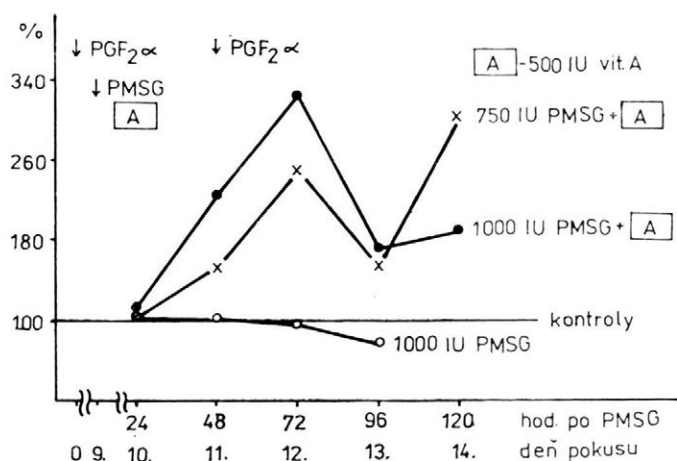
Materiál na histologické vyhodnocovanie sme odoberali po usmrtení zvierat 120 až 140 hodín od podania stimulačnej dávky, vizuálne zhodnotili a spracovali rovnako, ako je uvedené v predchádzajúcej práci (Molnárová a i., 1987).

VÝSLEDKY

Zmeny dynamiky trypsin inhibičnej aktivity (cTIA) krvnej plazmy oviec po synchronizácii činnosti ovárií podaním $2 \times 125 \mu\text{g}$ $\text{PGF}_2\alpha$ (v 0. a 11. deň) a stimulácii 1000 I.U. PMSG, 750 I.U. PMSG + 50 000 I.U. vitamínu A a 1000 I.U. PMSG + 50 000 I.U. vitamínu A v estri sú znázornené na obr. 1. Kontrolné hodnoty oviec po synchronizácii sú vyjadrené 100 %. Vplyv dávky 1000 I.U. PMSG na celkovú TIA bol odlišný od vplyvu kombinácie PMSG + vitamínu A, pričom zmeny neboli tak závislé od dávky PMSG ako od toho, či bol podaný samostatne alebo v kombinácii s vitamínom A. Rozdiely odpovedí na uvedené stimulácie (obr. 2) sú vidieť aj na zmenách dynamiky frakcie nízkomolekulových

2. Zmeny dynamiky nízkomolekulovej trypsin inhibičnej aktivity krvnej plazmy oviec po synchronizácii a stimulácii ovárií v estri (október—november) — Changes in the low-molecular trypsin-inhibition activity of the blood plasma of ewes after synchronization and stimulation of the ovaries in oestrus (October—November)

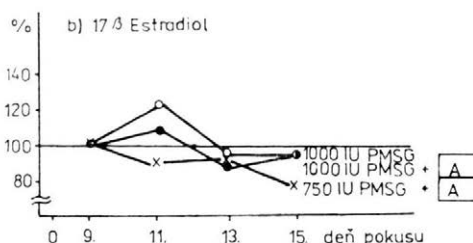
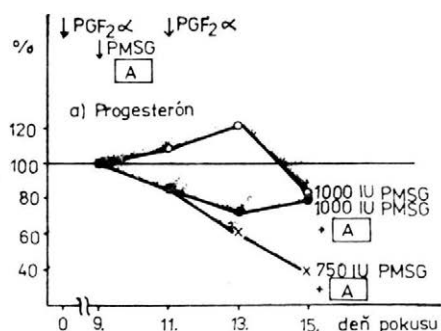




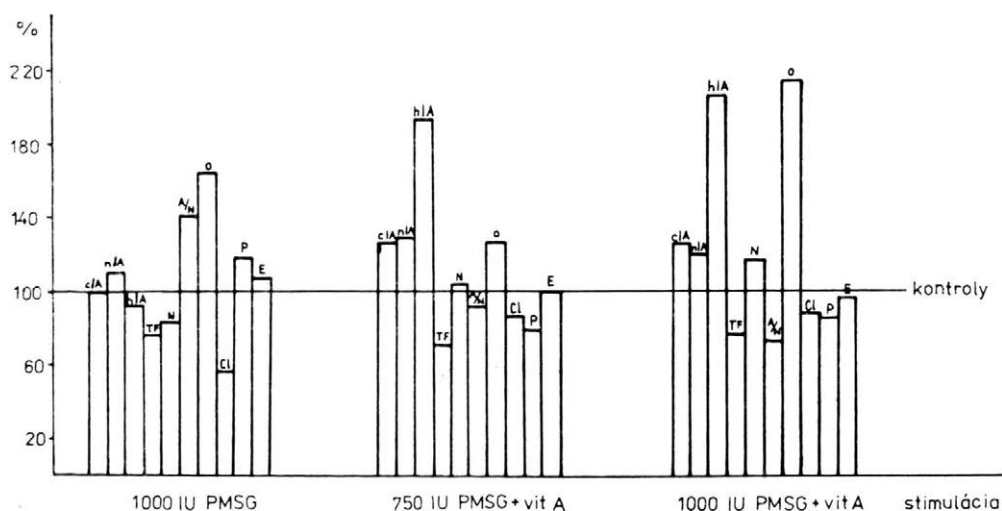
3. Zmeny dynamiky trypsin inhibičnej aktivity cervikálneho hlienu oviec po synchronizácii a stimulácii ovárií v estri (október—november) — Changes in the trypsin-inhibition activity of the cervical mucus of ewes after synchronization and stimulation of the ovaries in oestrus (October—November)

TIA (nTIA) počas 120 hodín od podania PMSG a vitamínu A. Podanie vitamínu A súčasne s PMSG znížilo v prvých 72 hodinách n-TIA, zatiaľ čo v 96. a 120. hodine sme zaznamenali prudký vzrast. Dávka PMSG samotného naopak spôsobila v prvých 96 hodinách zvýšenie a v 120. hodine mierny pokles. Zmeny dynamiky TIA cervikálneho hlienu oviec boli podobne odlišné po podaní PMSG samotného alebo PMSG s vitamínom A a sú znázornené na obr. 3. Charakteristický je pokles TIA v čase predpokladanej ovulácie 96 hodín od podania stimulačných dávok. Zmeny koncentrácií progesterónu na obr. 4a a 17-beta estradiolu na obr. 4b ukazujú na odlišné stimulačné pôsobenie PMSG samotného a v kombinácii s vitamínom A. Zmeny koncentrácií progesterónu do 96 hodín po podaní PMSG sú opačné ako po podaní kombinácie, zatiaľ čo zmeny koncentrácií 17-beta estradiolu sa neodlišujú tak výrazne v závislosti od podaní kombinácií (vitamínu A).

Zmeny priemerných hodnôt celkovej aj nízkomolekulovej TIA (cTIA, nTIA) krvnej plazmy, TIA cervikálneho hlienu, sú na obr. 5 porovnané so zmenami priemerného počtu celkových a neatretických terciárnych



4. Zmeny koncentrácií progesterónu (a) a 17-beta estradiolu (b) v krvnej plazme oviec po synchronizácii a stimulácii ovárií v estri (október—november) — Changes in the concentrations of progesterone (a) and 17-beta oestradiol (b) in the blood plasma of ewes after synchronization and stimulation of the ovaries in oestrus (October—November)



5. Zmeny priemerných hodnôt celkovej (cIA) a nízkomolekulovej (nIA) trypsin inhibičnej aktivity (TIA) krvnej plazmy, TIA cervikálneho hlienu (hIA), počtu terciárnych (TF) a neatretických (NTF) folikulov, pomeru atretických folikulov (A) k neatretickým terciárnym folikulom (NTF), počtu žltých teliesok (Cl), ovulácií (o), progesterónu (P), 17-beta estradiolu (E) oviec po synchronizácii a stimulácii ovárií v estri — Changes in the average values of total (cIA) and low-molecular (nIA) trypsin inhibition activity (TIA) of the blood plasma, TIA of the cervical mucus (hIA), number of tertiary (TF) and non-atretic (NTF) follicles, ratio of atretic follicles (A) to non-atretic tertiary follicles (NTF), number of yellow bodies (Cl), ovulations (o), progesterone (P), 17-beta oestradiol (E) in ewes after synchronization and stimulation of the ovaries in oestrus

folikulov, so zmenami pomeru atretických (A) a neatretických (N) terciárnych folikulov (A/N), s priemerným počtom ovulácií a starých žltých teliesok a so zmenami priemerných koncentrácií progesterónu a 17-beta estradiolu. Vidíme, že podanie PMSG zvýšilo TIA krvnej plazmy, podanie kombinácie s vitamínom A toto zvýšenie zvýraznilo. Priemerná TIA cervikálneho hlienu po podaní PMSG poklesla, ale po podaní PMSG spolu s vitamínom A sa signifikantne zvýšila. Priemerné počty neatretických folikulov vzrástli, čo sa prejavilo aj v priaznivejšom pomere A/N. Zaujímavé je vymiznutie luteinizačnej formy atrézie terciárnych folikulov po stimuláciách PMSG + vitamínom A. Keď porovnávame stimulácie 1000 I. U. PMSG, vidíme, že súčasné podanie vitamínu A zvýšilo aj počty ovulácií. Priemerné koncentrácie progesterónu a 17-beta estradiolu po stimulácii PMSG vzrástli, pomer zmien koncentrácií progesterónu a 17-beta estradiolu bol 1,1, zatiaľ čo po podaní kombinácie sme zaznamenali pokles priemerných koncentrácií oboch hormónov a pomer zmien $P/E = 0,81$ po 750 I. U. PMSG + vitamínu A a $P/E = 0,90$ po 1000 I. U. PMSG + vitamínu A.

Zmeny priemernej TIA cervikálneho hlienu, priemerného počtu cervikálnych žliaz a percent zastúpenia ich plochy sú uvedené v tab. II. Vidíme, že vzrast TIA cervikálneho hlienu je spôsobený skôr zvýšenou činnosťou týchto žliaz, ako zvýšením ich počtu alebo zväčšením ich plochy. Túto domnienku podporujú aj zistenia uvedené v tab. III, že sa zvýšila hrúbka epitelu žliaz krčku maternice výraznejšie po podaní kombinácií PMSG a vitamínu A.

II. Zmeny TIA cervikálneho hlienu (c. h.), počtu cervikálnych žliaz (c. ž.) a plochy cervikálnych žliaz oviec po synchronizácii (PGF₂alfa) a stimulácii (PMSG, vitamín A) ovárií oviec v estri — Changes in the TIA of the cervical mucus (c. h.), number of cervical glands (c. ž.), and area of the cervical glands of ewes after the synchronization (PGF₂alpha) and stimulation (PMSG, vitamin A) of the ovaries of ewes in oestrus

Skupina oviec	Počet (n)	TIA c. h. ‰	Počet c. ž. ‰	Plocha c. ž. ‰
I. K	5	100	100	100
II. 1000 I. U. PMSG	5	92,0	87,15	83,26
III. 750 I. U. PMSG + vit. A.	5	192,4	81,56	56,83
IV. 1000 I. U. PMSG + vit. A.	5	205,5	131,30	116,20

DISKUSIA

Vplyv vitamínu A [50 000 I. U.] podaného *i. m.* po synchronizácii PGF₂alfa na stimulačný účinok PMSG [750 a 1000 I. U.] sme sledovali v estrickom období (október). Priaznivý vplyv vitamínu A na pomer neatretických folikulov ku atretickým terciárnym folikulom je pravdepodobne spôsobený vplyvom tohto vitamínu na glykoproteíny membrán folikulárných buniek. V našich predchádzajúcich pokusoch, vykonávaných v anestrickom období, stimulácia samotným PMSG zvyšovala pomer atretických ku neatretickým terciárnym folikulom (A/N) a znižovala priemerné hodnoty plazmatických TIA [Arendarčík a i., 1983; Molnárová a Arendarčík, 1987]. Toto zvýšenie A/N sme pozorovali aj po podaní kombinácií PGF₂alfa (2 × 250 µg a 2 × 100 µg) + 750 I. U. PMSG v anestrii. Tu ale zmeny priemerných hodnôt plazmatických TIA neboli tak výrazné [Molnárová a Arendarčík, 1987]. V predkladanej práci sme zistili pri súčasnom podaní PGF₂alfa (2 × 125 µg) + PMSG [750 a 1000 I. U.] a vitamínu A zvýšenie priemernej celkovej aj nízkomolekulovej TIA a zníženie pomeru atretických

III. Zmeny hrúbky epitelu cervikálnych žliaz oviec po synchronizácii (PGF₂alfa) a stimulácii (PMSG, vitamín A) ovárií oviec v estri — Changes in the epithelium thickness of the cervical glands of ewes after the synchronization (PGF₂alpha) and stimulation (PMSG, vitamin A) of the ovaries of ewes in oestrus

Skupina oviec	Počet (n)	TIA c. h.	Epitel	
			cervixu	c. ž.
I. K	5	100,0	100,00	100,0
II. 1000 I. U. PMSG	5	92,0	120,94	133,3
III. 750 I. U. PMSG + vit. A	5	192,0	104,60	136,1
IV. 1000 I. U. PMSG + vit. A	5	205,5	125,00	157,5

a neatretických terciárnych folikulov. Aj keď v októbri nepredpokladáme nedostatok karoténov v kŕmnej dávke pokusných oviec, predsa len podanie vitamínu A súčasne so stimulačnou dávkou PMSG v estrickom období malo priaznivý vplyv na zvýšenie podielu neatretických terciárnych folikulov. U kráv tento pozitívny účinok vitamínu A na reprodukčné parametre nebol pozorovaný (Wang a i., 1982). Rozdielny metabolizmus a požiadavky na vitamín A a beta karotény s ohľadom na reprodukciu opisujú u kráv a ošípartých Chew a i. (1984) a u krýs Chew a Archer (1983). Keďže retinol sa v potrave vyskytuje len v malej miere, majú organizmy k dispozícii celý rad mechanizmov, ktorými premieňajú jeho provitamíny na aktívny vitamín A. Procesy rezorpcie, transport, chemické zmeny v molekule sú regulovateľné a ich spolupôsobenie určuje u jednotlivých druhov, ale aj u jedincov, potrebné množstvá vitamínu A alebo jeho provitamínov. Olson (1986) opisuje spolupôsobenie vitamínu E na metabolizmus vitamínu A. Chew a i. (1984) opisujú v proteínovom metabolizme zmeny, ktoré môžu vplyvať na potrebu a využitie vitamínu A a jeho prekursorov. Moor a i. (1985) zistili, že podanie superovulačnej dávky PMSG vedie k nerovnomernému vývoju rôznych kompartmentov folikulov oviec, k zmenenému proteínovému metabolizmu, čo nakoniec vedie k vývoju abnormálneho oocyту a vytvára nevhodné prostredie v pohlavnom aparáte. Imoedemhe a Shaw (1986) opisujú možnosť predpovedať fertilizačnú kapacitu oocytov zo stanovenia antitryptickej aktivity folikulárnej tekutiny. Pri hľadaní príčin zvýšeného počtu neovulovaných folikulov bola vyslovená domnienka, že zmeny aktivít proteáz a antiproteáz ako následok hormonálnej nerovnováhy po stimuláciách môžu byť príčinou porúch. Naše zistenia, že po podaní kombinácie PMSG + vitamínu A sa zvyšuje pomer zmien estrogénov (E) : progesterónu (P) na $E/P = 1,23$ a $1,112$ oproti pomeru u kontrolných oviec ($E/P = 1,0$), by mohli svedčiť o priaznivom účinku vitamínu A. Je však známe, že vysoká hladina folikulárneho estradiolu, doprevádzaná poklesom koncentrácie progesterónu a nízkou koncentráciou androstendiónu, vytvárajú predpoklady pre úspešnú fertilitu a delenie oocytov (Carson a i., 1982 a iní). Vývoj individuálnych folikulov vo vaječníku nemôže byť vysvetľovaný len zmenami koncentrácií cirkulujúcich biologicky aktívnych látok a dôležitou úlohou lokálne modulačných faktorov v parakrinnej kontrole folikulárneho vývoja (Hsueh, 1986). Bagdarian a i. (1981) zistili, že ovariálne bunky strómy obsahujú alfa₁-proteázový inhibítor, hlavný sérový inhibítor proteáz. Domnievajú sa, že proteázový inhibítor môže byť syntetizovaný týmito bunkami. Aj keď neboli schopní dokázať pravdepodobnú úlohu antiproteázy na ovariálnej úrovni, predpokladajú jej účasť pri ovuláciách. Ichikawa a i. (1983) opísali vplyv rôznych proteinázových inhibítorov na ovulácie explantovaných ovárií škrečkov a dokázali účasť aj serinových proteínáz a kolagenázy pri ruptúre Graafovho folikulu. Abramowitz a Birnbaumer (1979) opísali integrujúcu úlohu serinových proteáz pri hormonálnej stimulácii ovariálnej adenylátcyklázy krýs. Reich a i. (1986) zistili, že plazminogénový aktivátor, zúčastňujúci sa na aktivačnom procese kolagenolýzy vo folikule, je regulovaný gonadotropínami a že jeho produkcia je zvyšovaná 17-beta estradiolom. Domnievajú sa, že tkanivový typ plazminogénového aktivátora je zodpovedný za ruptúru v čase ovulácie. Keďže ruptúra terciárneho folikulu je zložitý pochod (Ichikawa a i., 1983), na ktorom sa

zúčastňuje celý rad proteínáz, mohli by pozorované zmeny TIA krvnej plazmy naznačovať účasť na týchto dejoch.

Porovnaním dynamiky zmien TIA a priemerných hodnôt TIA krvnej plazmy oviec po podaní PGF₂alfa (2 × 100 µg v januári a 2 × 250 µg v máji) a PMSG v anestrí (Molnárová a Arendarčík, 1987) vidíme jednak odlišný priebeh hodnôt TIA v jednotlivých dňoch pokusu (hlavne výrazný pokles celkovej TIA v 11. a 12. dni pokusu v anestrí, ktorý sa v estrickom období po podaní vitamínu A a PMSG neprejavil), jednak odlišné priemerné hodnoty TIA (Arendarčík a i., 1983), ktoré po podaní PGF₂alfa + PMSG alebo PGF₂alfa v anestrí neboli v korelácii s priaznivým pomerom neatretických a atietických terciárnych folikulov. Hodnoty TIA cervikálneho hlienu po podaní PMSG v anestrickom období a zníženie po podaní PMSG v anestrí bolo výraznejšie (53,3 % hodnôt kontrolných v anestrí oproti 92 % v estrickom období). Podanie vitamínu A súčasne s PMSG zvýšilo priemerné hodnoty TIA cervikálneho hlienu, čo by mohlo nepriaznivo ovplyvniť fertilitu spermii v pohlavnom aparáte takto ošetrovaných oviec (Robinson a i., 1986). Keď ale porovnáme tieto priemerné hodnoty TIA cervikálneho hlienu s hodnotami v anestrickom období po ošetrovaní oviec agelínovými hubkami (Arendarčík a i., 1983), zistíme, že agelín signifikantne zvyšuje TIA cervikálneho hlienu. Toto zvýšenie sa ešte zvýrazní po podaní 750 I. U. PMSG po synchronizácii agelínom a až dávka 1000 I. U. PMSG po aplikácii agelínu vyvolá zníženie. Zvýšenie hodnôt TIA cervikálneho hlienu v čase dominancie progesterónu v spontánnom ovariálnom cykle opísali viacerí autori (napr. Schumacher a i., 1972) a pripisujú mu úlohu ochrany pred proteínázami spermii v čase nevhodnom pre oplodnenie.

Mechanizmy zodpovedné za dozrievanie oocytov a ruptúru folikulov zostávajú neúplne vysvetlené. Aj keď koncentrácie steroidných hormónov a ich vplyv na vývoj folikulu a oocytu sú pomerne hlboko preštudované, je zrejmé, že nie sú jedinými biochemickými kritériami tohto fyziologického fenoménu. Je možné, že defekty v aktivitách proteáz a antiproteáz spôsobia na rôznych úrovniach poruchy vo vývoji oocytov. Zistenia cyklických zmien TIA krvnej plazmy a cervikálneho hlienu alebo zmenených alfa₁ antiproteázových aktivít vo folikulárnej tekutine pri atréziách oocytu túto teóriu podporujú.

Zistený vplyv vitamínu A (50 000 I. U.) podaného *i. m.* po synchronizácii PGF₂alfa spolu so 750 a 1000 I. U. PMSG na priebeh zmien a na priemerné hodnoty TIA krvnej plazmy a cervikálneho hlienu naznačujú zmenený metabolismus týchto biologicky aktívnych látok. Rozdielny účinok vitamínu A sa odzrkadľuje na rôznych úrovniach, či už v koncentráciách progesterónu a estradiolu, v pomere atretických a neatretických folikulov v kvantitatívnych a kvalitatívnych zmenách TIA krvnej plazmy, priemernom počte ovulácií, alebo na histomorfologických zmenách krčku maternice a TIA cervikálneho hlienu.

Literatúra

- ABRAMOWITZ, J. — BIRNBAUMER, L.: Effect of trypsin, protease inhibitors and ethanol on *corpus luteum* adenyl cyclase. Biol. Reprod., 21, 1979, s. 213-217.
ARENDAŘÍK, J. — MOLNÁROVÁ, M. — TOKOŠ, M.: Stimulation of sheep ovaries, production of ova, speed of their displacement and localization in the

- sexual tract, trypsin inhibiting activity (TIA) in plasma and cervical mucus. *Poľnohospodárstvo*, 29, 1983, s. 1092-1103.
- BAGDARASIAN, A. — WHEELER, J. — STEWARD, G. J. — AHMED, S. S. — COLMAN, R. W.: Isolation of alpha protease inhibitor from human normal and malignant ovarian tissue. *J. clin. Invest.*, 67, 1981, s. 281-291.
- BATES, C. J.: Vitamin A in pregnancy and lactation. *Proc. nutr. Soc.*, 42, 1983, s. 65-79.
- CARSON, R. S. — TROVSON, A. O. — FINDLAY, J. K.: Successful fertilization of human oocytes *in vitro*: Concentration of estradiol 17-beta, progesterone and androstendione in the antral fluid of donor follicles. *J. clin. Endocrin. Metab.*, 55, 1982, s. 798-800.
- CENTOLA, G.: Light microscopic observations of alterations in staining of the *zona pellucida* of porcine follicular oocytes: Possible early indication of atresia. *Gamete Res.*, 6, 1982, s. 293-304.
- ESPEY, L.: Ovarian proteolytic enzymes and ovulation. *Biol. Reprod.*, 10, 1974, s. 216-235.
- ESPEY, L.: Ovulation as an inflammatory reaction — A hypothesis. *Biol. Reprod.*, 22, 1980, s. 73-106.
- HSUEH, A. J. W.: Paracrine mechanisms involved in granulosa cell differentiation. *Clin. Endocrin. Metab.*, 15, 1986, s. 117-134.
- CHEW, B. P. — ARCHER, R. G.: Comparative role of vitamin A and neonate survival in rats. *Theriogenology*, 20, 1983, s. 459-472.
- CHEW, B. P. — HOLPUCH, D. M. — OFALON, J. V.: Vitamin A and beta carotene in bovine and porcine plasma, liver, *corpora lutea* and follicular fluid. *J. Dairy Sci.*, 67, 1984, s. 1316-1322.
- CHYTIL, F.: Retinoic acid: Biochemistry, pharmacology, toxicology and therapeutic use. *Pharmacol. Rev.*, 36, 1984, s. 93-100.
- CHYTIL, F.: Vitamin A: Its role in differentiation and development. *Nutr. Diseases: Research directions in comparative pathobiology*. Ed. Alan R. Liss, Inc., 1986, s. 21-31.
- ICHIKAWA, S. — MORIOKA, H. — OHTA, M. — ODA, K. — MURAO, S.: Effect of various proteinase inhibitors on ovulation of explanted hamster ovaries. *J. Reprod. Fert.*, 68, 1983, s. 407-412.
- IMOEDENHE, D. — SHAW, R. W.: Follicular fluid alpha antitrypsin correlation with fertilizing capacity of oocytes. *Brit. J. Obstet. Gynaec.*, 93, 1986, s. 863-868.
- LÉVEILLÉ, M. C. — ROBERTS, K. D. — CHEVALIER, S. — CHAPDELAINÉ, A. — BLEAU, G.: Formation of the hamster *zona pellucida* in relation to ovarian differentiation and follicular growth. *J. Reprod. Fert.*, 79, 1987, s. 173-183.
- MOLNÁROVÁ, M.: Inhibitory trypsinu v cervikálnom hliene niektorých hospodárskych zvierat. [Kandidátska dizertačná práca.] Košice 1975. 70 s. — Vysoká škola veterinárska.
- MOLNÁROVÁ, M. — ARENDARČIK, J.: Zmeny trypsin inhibičných aktivít krvnej plazmy a cervikálneho hlienu oviec po podaní PGF₂alfa a PMSG v anestrii. *Veter. Med. (Praha)*, 32, 1987, č. 11, s. 659-668.
- MOLNÁROVÁ, M. — ARENDARČIK, J. — TOKOŠ, M.: Vplyv PMSG na trypsin inhibičné aktivity (TIA) krvnej plazmy, cervikálneho hlienu a niektoré reprodukčné orgány oviec v anestrii. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988, č. 2, s. 000-000.
- MOOR, R. M. — OSBORN, J. C. — CROSBY, I. M.: Gonadotropin-induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fert.*, 74, 1985, s. 167-172.
- OLSON, J. A.: Biological roles of retinol and other retinoids. *Metabolism of vitamin A*. *Biochem. Soc. Trans.*, 14, 1986, s. 928-930.
- OMORI, M. — CHYTIL, F.: Mechanism of vitamin A action. *J. biol. Chem.*, 257, 1982, s. 14370-14373.
- REICH, R. — MISKIN, R. — TSAFRIRI, A.: Intrafollicular distribution of plasminogen activators and their hormonal regulation *in vitro*. *Endocrinology*, 119, 1986, s. 1588-1593.
- ROBINSON, R. — RICHARDSON, R. — HINDS, K. — CLAYTON, D. — POIRIER, G. R.: Features of seminal proteinase inhibitor — *zona pellucida* — Binding component on murine spermatozoa. *Gamete Res.*, 16, 1986, s. 217-228.
- SCHOCHET, S.: A suggestion as to the process of ovulation and ovarian cyst formation. *Anat. Rec.*, 10, 1916, s. 447.
- SCHUMACHER, G. F. B. — KIM, M. H. — HOSSEIMIAN, A. H. — DUPON, C.: Immunoglobulins proteinase inhibitors, albumin and lysosymes in human cervical mucus. *Amer. J. Obstet. Gynaec.*, 129, 1977, s. 629-636.

WANG, J. Y. — LARSON, L. L. — OWEN, F. G.: Effect of beta carotene supplementation on reproductive performance of dairy heifers. *Theriogenology*, 18, 1982, s. 461-473.

WOLF, G. — LEWIN, L. V. — BOLMER, S. D.: Multiple functions of vitamin A: Nuclear and extranuclear. Modulation and mediation of cancer by vitamins. Basel, Karger 1983, s. 146-152.

Dostlo dňa 29. 4. 1937

МОЛНАРОВА, М. — АРЕНДАРЧИК, Й. (Ветеринарный институт, Кошице): Влияние витамина А на трипсин ингибирующие активности (ТИА) плазмы крови и слизи шейки матки после гормонального влияния на оварии овец в эструсном периоде. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 155-164.

Влияние витамина А (50 000 I.U.) примененного после синхронизации эструса простагландином (2 X 125 μ g; 1 и 11 день) вместе с СЖК (750 и 1000 I.U.) на изменения динамики трипсин ингибирующих активностей (ТИА) плазмы крови было более выразительным, чем влияние СЖК. Также средние значения ТИА в течение 120 часов от применения стимулирующей дозы показывают больше изменений в зависимости от витамина А. После применения 1000 I.U. СЖК повысились лишь значения фракции низкомолекулярной ТИА, в то время как после применения СЖК + витамин А выразительно повысились все наблюдаемые ТИА. Это повышение находилось в прямой корреляции с повышенным количеством неатретических третичных фолликулов, с повышенным количеством овуляций (при одинаковой дозе СЖК) и сниженным соотношением изменений концентрации прогестерона (П) и 17- β эстрадиол (Э), П/Э = 0,81 по 750 I.U. СЖК + витамин А и П/Э = 0,90 по 1000 I.U. СЖК + витамин А. Возрастное среднее ТИА слизи шейки матки обусловлено скорее повышенной секреторной деятельностью желез маточной шейки как их увеличением после стимулирования оварий.

синхронизация; стимулирование; оварии; простагландин; СЖК; прогестерон; 17- β эстрадиол; воспроизводственные органы

MOLNÁROVÁ, M. — ARENDARČIK, J. (University of Veterinary Medicine, Košice): The Effect of Vitamin A on the Trypsin-Inhibition Activities (TIA) of the Blood Plasma and Cervical Mucus of Ewes with Hormonally Treated Ovaries in Oestrus. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 155-164.

Vitamin A (50 000 I.U.), administered after oestrus synchronization by PGF α (2 X 125 μ g; 1st and 11th day) together with PMSG (750 and 1000 I.U.), had a stronger influence on the changes in the trypsin-inhibition activities (TIA) of the blood plasma, as compared with the effect of PMSG. The changes in the average TIA values within 120 hours after the administration of the stimulating dose were also observed more frequently to depend on vitamin A. After administration of 1000 I.U. PMSG, an increase was recorded only in the values of the fraction of low-molecular TIA, whereas the administration of the combinations of PMSG + vitamin A resulted in an increase of all the TIA's under study. This increase was directly correlated with an increased number of non-atretic tertiary follicles, with an increased number of ovulations (at the same dose of PMSG), and with a reduced ratio of changes in the concentration of progesterone (P) and 17-beta oestradiol (E): P/E = 1.1 after the administration of 1000 I.U. PMSG, P/E = 0.81 after 100 I.U. PMSG + vitamin A, and P/E = 0.90 after 1000 I.U. PMSG + + vitamin A. The increase in the average TIA of the cervical mucus is due to the increased secretory activity of the cervical glands rather than to the multiplication of these glands after ovary stimulation.

synchronization; stimulation; ovaries; PGF α ; PMSG; progesterone; 17-beta oestradiol; reproduction organs

Adresa autorov:

Ing. Marie Molnárová, CSc., prof. MVDr. Jozef Arendarčík, DrSc., Vysoká škola veterinárská, Komenského 73, 041 81 Košice

POUŽITÍ RADIOIMUNOLOGICKÉHO STANOVENÍ MYKOTOXINU OCHRATOXIN A KE SCREENINGOVÉ KONTROLE POTRAVIN A KRMIV ROSTLINNÉHO PŮVODU — TYPU OBILOVIN

J. Ruprich, A. Piskač, J. Malá

RUPRICH, J. — PISKAČ, A. — MALÁ, J. (Institut hygieny a epidemiologie, Brno; Vysoká škola veterinární, Brno): *Použití radioimunologického stanovení mykotoxinu ochratoxin A ke screeningové kontrole potravin a krmiv rostlinného původu — typu obilovin*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 165-173.

Byla ověřena možnost jednoduché přípravy vzorků potravin a krmiv rostlinného původu při radioimunologickém stanovení ochratoxinu A. Všechny 27 vyšetřených vzorků potravin vyhovělo hygienickým předpisům pro potraviny obecně (NPK — ochratoxin A 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), stejně jako všech 23 vzorků vyšetřovaných krmiv. Navrhovaný postup přípravy vzorků není vhodný pro vyšetřování potravin živočišného původu, protože je možná interference některých bílkovin (albumin).

příprava vzorků; radioimunologické stanovení (RIA); hygienické předpisy

Mykotoxiny ochratoxiny jsou sekundární produkty metabolismu některých plísní rodu *Aspergillus* a *Penicillium*. Mezi ochratoxiny vyniká svou toxicitou zejména ochratoxin A (OCHA). Jeho hepatotoxický a zejména nefrotoxický účinek je příčinou onemocnění domácích zvířat i člověka (Krogh, 1978). Od poloviny 60. let, kdy byl ochratoxin A objeven, je mu v řadě zemí věnována značná pozornost. Problémy spojené s jeho výskytem byly popsány v mnoha publikacích ze sousedních přímořských zemí. Velká pozornost byla problematice jeho výskytu věnována např. v Polsku (Chelkowski a Golinski, 1983; Golinski aj., 1985).

U nás popsali případ akutní intoxikace prasat Piskač aj. (1979). Problematikou výskytu se zabývali Kusák aj. (1980). Toxický efekt ochratoxinu A na kuřecích embryích studovali Veselá aj. (1983).

Toxikologické studie i běžná diagnostika vyžadují účinné metody stanovení. V našich podmínkách je využíváno především různých chromatografických metod (Kusák aj., 1980; AOAC, 1980). Novou metodou průkazu je radioimunologické stanovení (RIA) (Ruprich aj., 1988). V zahraničí je imunochemická metoda používána v různých provedeních (např. Rousseau aj., 1985). Objevilo se již i ELISA stanovení používající monoklonální protilátky (Candlish aj., 1986). Společným problémem všech těchto stanovení je jednoduchá, ale účinná příprava vzorků. Většina citovaných metodických postupů je zaměřena na vyšetření jednoho typu vzorku.

Cílem naší práce bylo navrhnout a ověřit jednoduchý způsob přípravy vzorků rostlinného původu, typu cereálií, ke screeningovému vyhledávacímu stanovení ochratoxinu A pro dříve vypracovanou metodu RIA (Ruprich aj., 1988). Z publikovaných zahraničních pramenů se našim požadavkům nejvíce blížil způsob přípravy vzorků, který vyzkoušeli Lee a Chu (1984). Použili jsme jej jako výchozího postupu.

MATERIÁL A METODY

Při práci jsme použili tyto látky: ochratoxin A připravený postupem, který popsali Ruprich a Piskač (1987), ^{125}I -ochratoxin, který připravili Vereš a Schmiedová (1986), protilátky proti ochratoxinu A (OCHA-BSA) (Ruprich, 1986), bovinní sérový albumin (BSA) (Bioвета), humánní sérový albumin (HSA) (Calbiochem 12666), vaječný albumin (EGA) (Sigma A 5503) a další běžné chemikálie.

Použité přístroje: měřič gama záření NRG 603 (Tesla), Specord M 40 (Carl Zeiss, Jena), autodilutor Chiratic-21 (Chirana) a další běžná laboratorní zařízení.

Radioimunologické stanovení bylo provedeno postupem podle Rupricha aj. (1987).

POUŽITÍ AUTODILUTORU CHIRATIC-21 K PŘÍPRAVĚ RIA

Abychom zrychlili přípravu stanovení a omezili chyby vznikající při pipetování jednotlivých složek, vyzkoušeli jsme autodilutor Chiratic-21 k dávkování složek stanovení. Postup byl tento: Bezprostředně před použitím byl smíchán naředěný radioligand a protilátka v poměru 1:1. Vzniklým roztokem byl zaplněn dávkovací systém přístroje, který byl sestaven pro režim autodilutor (válec dispenzoru reagentie III a válec dispenzoru vzorku). Pro dávkování reagentie (směs radioligandu a protilátky) byl zvolen objem 200 μl . Standardy a vzorky byly předem připraveny k pipetování. Vlastní pipetování probíhalo tak, že prvním krokem bylo nasáto 0,1 ml standardu nebo vzorku a druhým krokem byl tento roztok napipetován do reakční zkumavky, včetně 0,2 ml reagentie. Roztoky pro určení celkové radioaktivity a nespecifické vazby byly pipetovány ručně. Mrtvý objem autodilutoru činil po zkrácení teflonových hadic asi 6 ml. V případě, že se pro separaci použilo 25% PEG, byl autodilutor použit i k jeho dávkování. Suspenze aktivního uhlí Norit A musí být dávkována ručně.

ZJIŠTĚNÍ ÚČINNOSTI EXTRAKCE VZORKŮ

^{125}I -ochratoxin je látka, které lze použít pro orientační zjišťování účinnosti extrakce. Byla použita metoda standardního přídávku ^{125}I -ochratoxinu ke vzorku.

PŘÍPRAVA VZORKU PRO STANOVENÍ

1. 100 g vzorku, odebraného podle platných pravidel, zhomogenizujeme a vysušíme.
2. 5 g suchého homogenizovaného vzorku extrahujeme 30 ml metanolu po dobu 15 minut. Extrakt přefiltrujeme.
3. 3 ml získaného extraktu odpaříme do sucha a odparek rozpustíme v 1 ml metanolu.
4. 0,1 ml takto připraveného roztoku přidáme k 0,9 ml 0,5% roztoku kaseinu ve fosfátovém pufru.
5. 0,1 ml vzniklého roztoku pipetujeme do RIA stanovení.

Přepočítávací faktor z výsledků RIA stanovení na mikrogramy OCHA na kilogram suchého substrátu činí 0,2. Při účinnosti extrakce 100% tedy 10 pikogramů odečtených v RIA stanovení znamená 2 mikrogramy OCHA na kilogram vzorku. V reakční zkumavce je při stanovení extrakt z 5 mg vzorku.

Sklo kontaminované ^{125}I -ochratoxinem dekontaminujeme 24 hodiny v lázni 2,5% roztoku sirnatanu sodného v 1M louhu sodném (ICRP, 1978). Sklo pak uložíme do speciálních nádob na kontaminovaný materiál. Sklo kontaminované ochratoxinem A dekontaminujeme 24 hodiny v lázni obsahující 5% louhu sodného a 3% chlornanu sodného (Kusák aj., 1980).

ZÁSADY OSOBNÍ OCHRANY PRACOVNÍKŮ

Vedle dodržování běžných zásad bezpečnosti práce při manipulaci s ochratoxinem doporučujeme používat jednorázový spotřební ochranný materiál, který likvidujeme spálením. Kontaminace povrchů těla (hlavně ruce) se kontroluje pomocí UV-lampy (360 nm). Je-li kontaminace zjištěna, doporučujeme omýt místo vodným alkalickým roztokem (např. sody), roztokem chloraminu, mýdlem a proudem vody.

VÝSLEDKY A DISKUSE

Uvedený postup přípravy vzorků byl vybrán a použit především proto, že je jednoduchý, časově nenáročný a má nízkou spotřebu organických rozpouštědel. Zároveň však přináší určité nevýhody spojené s nižší účinností extrakce, zvýšenou variabilitou výsledků a menší přesností v oblasti velmi nízkých koncentrací (pod $2\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$). V této oblasti koncentrací by bylo nutné použít v radioimunologickém stanovení vyšší obsah extraktů vzorků. Zvýšený podíl extraktu vzorků však může nepříznivě ovlivnit kvalitu výsledků, je-li vynecháno čištění. Účinnost extrakce vzorků byla v modelových pokusech pro rostlinné materiály typu cereálií stanovena na 80% (variační rozpětí = 72–87%, počet substrátů = 8). Variabilita výsledků, ovlivněná jak účinností extrakce, tak vlastním stanovením, byla testována opakovaným vyšetřením 47 vzorků se známým přídatkem OCHA. Mezi výsledky nebyl zjištěn párovým t -testem statisticky průkazný rozdíl ($P > 0,05$). Testován byl rovněž rozdíl mezi výsledky stanovení při separaci aktivním uhlím a PEG. Ani v tomto případě nebyl mezi výsledky 24 vyšetřovaných vzorků zjištěn statisticky průkazný rozdíl ($P > 0,01$). Jako citlivost RIA stanovení byla používána hodnota rovnající se ED 85% (efektivní dávka). Ve skutečnosti byla citlivost na hladině pravděpodobnosti 99% vyšší (87% nulového standardu — B_0). ED 85% se pohybovala v přepočtu okolo $2\text{ }\mu\text{g}$ OCHA na kilogram substrátu. Lze tedy předpokládat, že stanovení zachytí s pravděpodobností větší než 99% ty vzorky, u nichž obsah ochratoxinu A převyšuje tuto úroveň. Rozsah kalibrační křivky, určený hodnotami ED 85% — ED 15%, činil v průměru 2–50 μg OCHA na kilogram substrátu, a pokryl tak úroveň kontrolovaných nejvyšších přípustných koncentrací (NPK) pro dětskou a obecně lidskou výživu ($5,20\text{ }\mu\text{g}$ OCHA $\cdot\text{kg}^{-1}$), platných v ČSR.

Výsledky stanovení pod $2\text{ }\mu\text{g}$ OCHA na kilogram spadají do oblasti malé spolehlivosti. Mohou být také zatíženy chybou vznikající zanesením interferujících nečistot do stanovení, vzhledem k tomu, že bylo vynecháno čištění extraktů vzorků. Množství extraktu v reakční zkumavce odpovídá 5 mg vzorku. Toto množství např. ve stanovení ELISA (pro pšenici) (Lee a Chu, 1984) vyvolávalo falešnou inhibici ve výši 4,7% B_0 při citlivosti stanovení 25 pg. V našem zkoušeném stanovení

I. Výsledky screeningového vyšetření některých druhů potravin na obsah ochratoxinu A radioimunologickou (RIA) metodou (vzorky pocházejí z obchodní sítě v Brně — rok 1986) — The results of a screening control of some kinds of foods for the content of ochratoxin A by the radioimmunological assay (RIA). The samples were taken from the Brno retail network in 1986

Druh vzorku	Počet vzorků	Průměrný obsah OCHA v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Maximální obsah OCHA v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Krupice dětská	4	< 2,0	2,0
Kukuřičná Inka	3	2,8	3,4
Ovesné vločky	3	5,0	5,2
Bábovka - směs	3	< 2,0	< 2,0
Domácí chléb - směs	3	10,2	13,0
Kroupy	3	< 2,0	2,3
Pšeničná mouka	4	< 2,0	2,0
Strouhanka	4	< 2,0	2,0

Poznámka: Hodnoty vyšší než $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ byly potvrzeny TLC

přichází v praxi v úvahu — jako nejnižší kontrolovaná úroveň — $5 \mu\text{g OCHA} \cdot \text{kg}^{-1}$ (= NPK pro dětskou výživu). Tato úroveň odpovídá ve stanovení 25 pg, což v průměru představuje 40% inhibici B₀. Výsledky získané při screeningovém RIA stanovení jsme kontrolovali semikvantitativně pomocí chromatografie v tenké vrstvě silikagelu [Kusák aj., 1980]. Vzhledem k použitému způsobu čištění vzorků však praktická citlivost této metody nedovolovala spolehlivé semikvantitativní stanovení koncentrací pod $5 \mu\text{g OCHA}$ na kilogram vzorku. U vyšetřovaných vzorků typu cereálií jsme nezjistili takovou úroveň interference ve stanovení postupem RIA, jež by ovlivnila platnost výsledků screeningu na úrovni $5 \mu\text{g OCHA} \cdot \text{kg}^{-1}$. Z praktického hlediska proto považujeme možnou chybu za přijatelnou.

V tab. I uvádíme výsledky screeningového RIA stanovení OCHA v některých druzích potravin. Všech 27 vyšetřovaných vzorků potravin vyhovělo NPK pro potraviny obecně. Kromě směsi na výrobu domácího chleba vyhověly výsledky i požadavkům NPK pro dětskou výživu. V tab. II jsou shrnuty výsledky screeningového vyšetření některých druhů krmiv pocházejících z mísíren krmiv. Z celkového počtu 23 vzorků nepřevýšil hranici $20 \mu\text{g OCHA} \cdot \text{kg}^{-1}$ ani jeden, což lze považovat za příznivý výsledek. Pokusně jsme vyšetřili i některé druhy krmiv živočišného původu. Tab. III uvádí výsledky vyšetření. Stanovené hodnoty jsou v porovnání s ostatními vyšetřovanými vzorky vyšší, zejména u vzorků s vysokým podílem bílkovin. Chromatografie v tenké vrstvě nepotvrdila zjištěnou míru kontaminace. Z analýzy výsledků RIA stanovení vyplynulo, že ani v jednom z případů se průkazně nezvýšila úroveň nespecifické vazby (NSB) vzorků. Závěr tedy svědčí o interferujících látkách v extraktu nebo i o nepřesnosti chromatografické metody, jež je určena ke kontrole rostlinných substrátů. Abychom objasnili vliv bílkovin na uvedený postup RIA stanovení OCHA, udělali jsme následující pokus.

Je známo, že bílkoviny typu albuminu mají ve vztahu k OCHA tzv. nosičový efekt, což znamená možnost vazby OCHA na bílkoviny (Pest-

II. Výsledky screeningového vyšetření některých druhů krmiv na obsah ochratoxinu A radioimunologickou (RIA) metodou (vzorky pocházejí z mísení krmiv v oblasti Českomoravské vrchoviny — rok 1986) — The results of a screening control of some kinds of feeds for ochratoxin A content by the radioimmunological assay (RIA). The samples came from the feed-processing plants in the Bohemian-Moravian Uplands — year 1986

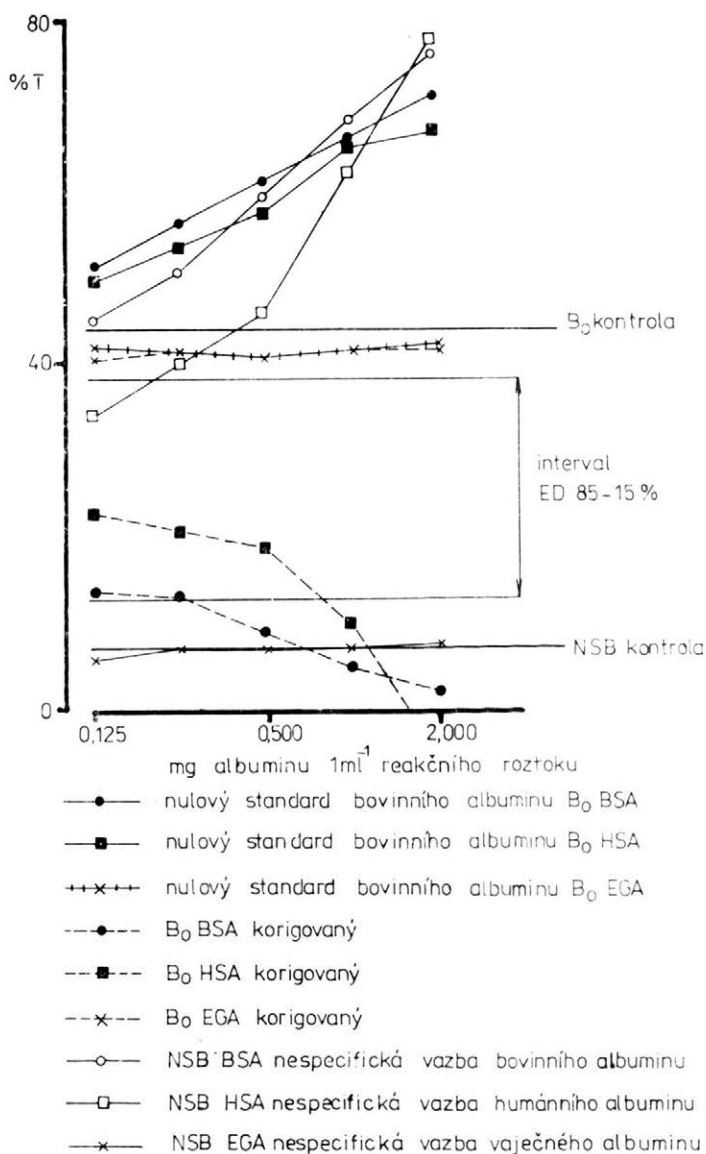
Druh vzorku	Počet vzorků	Průměrný obsah OCHA v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Maximální obsah OCHA v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
Směs BR 1	1	8,4	
Směs A 1	2	4,4	6,6
Sója	2	2,5	4,0
Hrách	1	3,8	
Úsušky	1	11,6	
Otruby	2	7,0	10,4
Směs A 3	1	8,8	
Přísady typu MVK	3	11,7	17,5
Ječmen	3	5,2	6,5
Směs ČOS	2	5,4	5,8
Šrot - sója	1	6,5	
Šrot - řepka	1	7,1	
Šrot - ječmen	1	3,2	
Šrot - pšenice	2	5,2	8,1

Poznámka: Hodnoty vyšší než $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ byly potvrzeny TLC, mimo vzorku úsušků, v němž byla při TLC prokázána nižší hladina OCHA (nejednalo se o cereálii)

ka aj., 1981). Pro pokus jsme zvolili tři druhy albuminů — boviní, humánní a vaječný. Již z období přípravy specifických protilátek jsme věděli, že může docházet k reakci specifické protilátky a BSA (zjištěno Ouchterlonyho imunodifúzní metodou v kombinaci s RIA). V pokusech jsme přidávali do prostředí RIA reakce určité množství albuminu a sledovali jsme jeho vliv na velikost B_0 a NSB. Výsledek byl porovnán

III. Obsah ochratoxinu A zjištěný screeningovou radioimunologickou (RIA) metodou v krmivech živočišného původu (vzorky pocházejí z mísení krmiv v oblasti Českomoravské vrchoviny — rok 1986) — The content of ochratoxin A determined by radioimmunological (RIA) screening in the feeds of animal origin. The samples came from the feed-processing plants in the Bohemian-Moravian Uplands — year 1986

Druh krmiva	Počet vzorků	Průměrný obsah OCHA v $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$	Výsledek TLC kontroly
Kostní moučka nevyklížená	1	33,6	< 20
Peřokostní moučka	1	10,4	< 20
Kostní vývar	1	10,5	< 20
Bílkovinný koncentrát BK 1	1	31,9	< 20
Bílkovinný koncentrát BK 2	1	35,3	< 20



1. Vliv přidavku bovinního (BSA), humánního (HSA) a vaječného (EGA) albuminu na RIA stanovení ochratoxinu A (OCHA) — The effect of addition of the bovine (BSA), human (HSA) and egg (EGA) albumin in RIA establishment of ochratoxin A (OCHA)

s kontrolou bez přidavku albuminu. Výsledky jsou patrné z obr. 1. Pokud by přidáný albumin nerušil použité stanovení (separace aktivním uhlím), bude průběh jeho závislosti vazby B₀ a NSB na velikosti přidavku albuminu totožný s kontrolou nebo v případě částečného rušení v intervalu B₀ — ED 85% (B₀ albuminu) a NSB — ED 15% (NSB albuminu). Pokud není uvedena podmínka splněna, ovlivňuje přidavek albuminu RIA reakci výrazně, což může vést k chybnému závěru screeningového RIA stanovení. Z obr. 1 je patrné, že podmínce vyhovuje pouze vaječný albumin [pro daný rozsah koncentrací!]. BSA i HSA v daných koncentracích výsledky stanovení výrazně ovlivňují. Hodnota B₀ i NSB se zvyšuje v závislosti na zvyšující se koncentraci albuminu v reakci. ¹²⁵I-ochratoxin se tedy váže na albumin a ten tak imituje specifickou protilátku. Za ur-

čitých okolností se tento nosičový efekt dá korigovat přepočtem zjištěné vazby vzorku na úroveň nespecifické vazby kalibrační křivky podle vztahu:

$$B_{\text{vz.korig}} = B_{\text{vz.}} + \text{NSB} - \text{NSB}_{\text{vz.}}$$

kde: $B_{\text{vz.korig}}$ — korigovaná hodnota vazby vzorku
 $B_{\text{vz.}}$ — zjištěná hodnota vazby vzorku
 NSB — nespecifická vazba standardů kalibrační křivky
 $\text{NSB}_{\text{vz.}}$ — nespecifická vazba vzorku

Korekce by byla účinná pouze tehdy, jestliže by korigovaná hodnota vazby B_0 albuminu vyhovovala výše definované podmínce (tj. odpovídala by kontrolním hodnotám B_0 nebo se jim blížila). Provedeme-li korekci, zjistíme jak u BSA, tak u HSA odlišný průběh závislostí, vzdáleně připomínající průběh kalibrační křivky RIA stanovení (obr. 1). Při korekci by tedy jak BSA, tak HSA imitoval pozitivní vzorek. Již koncentrace 0,125 % BSA nebo HSA v reakci RIA vede po korekci k inhibici větší než 50% vazby B_0 . Zjištěná fakta potvrzují předpoklad, že dané RIA stanovení není vhodné pro přímé vyšetřování biologických tekutin.

Při našem postupu přípravy vzorku pro stanovení jsme však použili extrakci do organického rozpouštědla — metanolu. To by mělo bránit extrakci bílkovin ze vzorku, ale pouze za podmínky, že je vzorek suchý! Tuto skutečnost jsme si ověřili pokusem se zvlhčováním suchého vzorku cereálií s přidávkou 0,2 % BSA. Spektrálním měřením při 280 nm jsme zjistili, že již při 10% zvlhčení se výrazně zvyšuje podíl BSA v extraktu. Proto tento postup není vhodný pro vlhké vzorky. V těchto případech bude potřebné postup přípravy ještě doplnit o jednoduchou čistící proceduru kombinovanou s použitím detergentů, jak uvádějí např. *Pestka aj.* (1981) nebo *Morgan aj.* (1983).

Přestože nelze zcela vyloučit interferenci nečistot vzorků v oblasti stanovení velmi nízkých koncentrací OCHA (okolo $2 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), považujeme navržený způsob screeningové kontroly obsahu OCHA v rostlinných substrátech typu cereálií za vyhovující. V daném uspořádání je stanovení příkladem vyhledávací metody při kontrole rozsáhlých souborů vzorků. Je vhodné např. pro plošný průzkum úrovně kontaminace potravin a krmiv rostlinného, cereálního původu, OCHA. Zabezpečuje, při nízkých nákladech na vyšetření, spolehlivý záchyt vzorků kontaminovaných OCHA již na úrovni $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Je-li výsledek screeningového RIA stanovení negativní (vzhledem k NPK), nemusíme vzorek dále vyšetřovat. Je-li pozitivní, je vhodné ověřit zjištěnou úroveň kontaminace jinou metodou, např. fyzikálněchemickou, nebo extrakt vzorku čistit a opakovat RIA stanovení.

Literatura

- CANDLISH, A. A. G. — STIMSON, W. H. — SMITH, J. E.: A monoclonal antibody to ochratoxin A. *Lett. appl. Microbiol.*, 3, 1986, s. 9-11.
 GOLINSKI, P. — HULT, K. — GRABARKIEWICZ-SZCZESNA, J. et al.: Spontaneous occurrence of ochratoxin A residues in porcine kidney and serum samples in Poland. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, 1985, s. 1014-1015.
 CHELKOWSKI, J. — GOLINSKI, P.: Mycotoxin in cereal grain. Part VII. A simple method to assay mycotoxin potential in cereal grain and cereal products. *Nahrung*, 24, 1983, s. 305-310.
 KROGH, P.: Causal associations of mycotic nephropathy. *Acta path. microbiol. scand.*, suppl. No 269, 1978, 28 s.

KUSÁK, V. — VESELÝ, D. — VESELÁ, D.: Výzkum vlastností a vznik aflatoxinů v potravinách. Ochratoxiny. [Závěrečná zpráva VÚ.] Olešnice v Orlických horách, ÚEM ČSAV 1980, s. 31-42.

LEE, S. C. — CHU, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. J. Assoc. off. analyt. Chem., 67, 1984, s. 45-49.

MORGAN, M. R. A. — MCNERNEY, R. — CHAN, H. W. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barley. J. Assoc. off. analyt. Chem., 66, 1983, s. 1481-1484.

Natural Poisons. Mycotoxins. Ochratoxins. Chapter 26. J. Assoc. off. anal. chem. Meth., 1980, s. 428-430.

PESTKA, J. J. — STEINERT, B. W. — CHU, F. S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A. Appl. Envir. Microbiol., 41, 1981, s. 1472-1474.

PISKAČ, A. et al.: Mykotoxická nefropatie prasat ve velkochovech. Veterinářství, 29, 1979, s. 253-255.

ROUSSEAU, D. M. — SLEGERS, G. A. — Van PETEGHEM, C. H.: Radioimmunoassay of ochratoxin A in barley. Appl. Envir. Microbiol., 50, 1985, s. 529-531.

RUPRICH, J.: RIA ochratoxin A. Seminář ČsVTS. Brno 1986, 5 s.

RUPRICH, J. — PISKAČ, A.: Příprava mykotoxinu ochratoxin A k výzkumným a diagnostickým účelům. Veter. Med. (Praha), 32, 1987, č. 11, s. 675-680.

RUPRICH, J. — VEREŠ, K. — SCHMIEDOVÁ, D.: Radioimunologické stanovení mykotoxinu ochratoxin A — nová diagnostická metoda v ČSSR. Veter. Med. (Praha), 33, 1988, č. 2, s. 101-108.

VEREŠ, K. — SCHMIEDOVÁ, D.: (¹²⁵I) Ochratoxin a způsob jeho přípravy. Patent. v. 6136 (5. 4. 1986).

VESELÁ, D. — VESELÝ, D. — JELÍNEK, R.: Toxic effects of ochratoxin A and citrinin, alone and in combination on chicken embryos. Appl. Envir. Microbiol., 45, 1983, s. 91-93.

Značení radioaktivním jódem a bezpečnost práce. Opatření při nehodě. Mezinárodní komise pro ochranu proti záření (ICRP) 1978.

Došlo dne 24. 3. 1987

РУПРИХ, Й. — ПИСКАЧ, А. — МАЛА, Й. (Институт гигиены и эпидемиологии, Брно; Ветеринарный институт, Брно): Использование радиоиммунологического установления микотоксина охратоксин А для скринингового контроля продуктов питания и кормов растительного происхождения — типа зерновых. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 165-173.

Byla проверена возможность простого приготовления образцов продуктов питания и кормов растительного происхождения во время радиоиммунологического установления охратоксина А. Всех 27 обследуемых образцов продуктов питания отвечали гигиеническим правилам для продуктов питания в общем (NPK — охратоксин А мг кг), точно так же, как и все 23 образца исследуемых кормов. Предложенный метод подготовки образцов не является подходящим для обследования продуктов питания животного происхождения, так как не исключена возможность интерференции некоторых белков (альбумин).

подготовка образцов; радиоиммунологическое установление (RIA); гигиенические правила

RUPRICH, J. — PISKAČ, A. — MALÁ, J. (Institute of Hygiene and Epidemiology, Brno; University of Veterinary Medicine, Brno): Using the Radioimmunological Assay of the Ochratoxin A Mycotoxin for the Screening Control of Cereal-Type Foods and Feeds of Plant Origin. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 165-173.

Trials were conducted to verify a simple procedure of preparing food and feed samples of plant origin for the radioimmunological assay of ochratoxin A. All 27 food samples subjected to testing met the general hygienic regulations for foods (NPK — ochratoxin A 20 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and so did all 23 samples of the tested feeds. The proposed method of sample preparation is not suitable for the examination of animal-origin foods because some proteins (albumin) might interfere.

sample preparation; radioimmunological assay (RIA); hygienic regulations

RUPRICH, J. — PISKAČ, A. — MALÁ, J. (Institut für Hygiene und Epidemiologie, Brno; Veterinärmedizinische Hochschule, Brno): *Anwendung der radioimmunologischen Bestimmung von Mykotoxin Ochratoxin A zur Screening-Kontrolle der Lebens- und Futtermittel pflanzlicher Herkunft vom Getreidetyp*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 165-173.

Es wurde die Möglichkeit zu einer einfachen Vorbereitung der Lebens- und Futtermittel pflanzlicher Herkunft bei der radioimmunologischen Bestimmung von Ochratoxin A überprüft. Alle 27 untersuchten Proben entsprachen den festgelegten hygienischen Vorschriften für Lebensmittel insgesamt und im allgemeinen (NPK — Ochratoxin A $20 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$), genauso wie die 23 untersuchten Futtermittelproben. Die vorgeschlagene Vorbereitung der einzelnen Proben ist für die Untersuchung der tierischen Lebensmittel keineswegs geeignet, weil die Interferenz einiger Proteine (Albumin) nicht auszuschliessen ist.

Probenvorbereitung; radioimmunologische Bestimmung (RIA); hygienische Vorschriften

Adresy autorů:

MVDr. Jiří Ruprich, Institut hygieny a epidemiologie, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Prof. MVDr. Alois Piskač, DrSc., ing. Jiřina Malá, Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Vybrané nejnovější tituly z oboru veterinární medicína ve fondu ÚZLK

- HERDTLE, P.: Physiologische Parameter als Hilfsmerkmale zur Abschätzung der Schlachtkörpwezusammensetzung in der Schafzucht. Diss. Hohenheim 1986. D 35.181 551
- Imunogenetika a biochemická genetika hospodářských zvířat. Praha 1987. D 79.691
17. Kongress der Deutschen veterinärmedizinischen Gesellschaft. Bad Nauheim, 1.—4. 4. 1987. Giessen 1987. D 79.554
- Nuclear and related techniques in animal production and health. Proceedings of a Symposium Vienna 17.—21. 3. 1986 Vienna 1986. D 63.294 717
- POVAŽENKO, I. Je. — BORISEVIČ: Bolezni konečností životných. Kijev 1987. D 79.656
- ROSSLENBROICH, B.: Untersuchungen zur Eignung von Fluosol als Perfusionsmedium in der isolierten Extremitätenperfusion. Diss. Giessen 1987. E 39.500 1087
- SCHOBRIES, H. D.: Geflügel Krankheiten. Berlin 1986. D 79.184
- SELL, D.: Untersuchungen über die Gehalte und Wechselbeziehungen von Cadmium, Blei, Eisen, Kupfer, Zink und Calcium in Leber bzw. Niere oder Muskulatur bei Kälbern. Diss. Giessen 1987. E 39.500 1039
- Sistema veterinarno-sanitarnych meroprijatij v promyšlennom pticevodstve. Kijev 1987. D 79.650
- STITZ, L.: Spezifische und unspezifische Abwehrreaktionen nach Virusinfektionen. Habilit. Giessen 1986. E 39.500 1113

REZIDUA CHLÓROVANÝCH PESTICIDŮ A POLYCHLÓROVANÝCH BIFENYLŮ VE VEPŘOVÉM MASE A ŠUNKÁCH V MINULÝCH LETECH A V SOUČASNOSTI

F. Kredl, J. Svobodník

KREDL, F. — SVOBODNÍK, J. (Státní veterinární ústav, Jihlava): *Rezidua chlórovaných pesticidů a polychlórovaných bifenyly ve vepřovém masu a šunkách v minulých letech a v současnosti*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 175-184.

Na obsah reziduí chlórovaných pesticidů a polychlórovaných bifenyly (PCB) bylo v roce 1986 vyšetřeno metodou plynové chromatografie s EC detektorem 682 vzorků šunek a 926 vzorků vepřového masa, pocházejících převážně z exportních závodů masného průmyslu. Tolerance reziduí chlórovaných pesticidů byla v tomto roce překročena u 0,4 % šunek a u 0,3 % vepřového masa. Limit PCB navrhovaný pro vepřové maso (1,0 mg . kg⁻¹ tuku) překročilo 0,7 % šunek a 0,8 % vzorků vepřového masa, což značí značné snížení reziduí PCB proti roku 1983, kdy tuto hranici překročilo 7,0 % šunek a 6,2 % vzorků vepřového masa. Toto snížení vyplývá ze skutečnosti, že u nás byla výroba PCB zastavena, že bylo omezeno jejich používání a že osoby pracující s přípravky obsahujícími PCB byli lépe informováni o jejich perzistenci, problémech reziduí atd. Maso divokých prasat je kontaminovanější než maso prasat domácích z velkochovů. Týká se to zejména reziduí sumy DDT (12,7 % vzorků masa divočáků překročilo limit 2,0 mg . kg⁻¹ tuku), ale i reziduí HCB, lindanu a PCB. U posledně jmenovaných chlórovaných uhlovodíků však nebyl ani v jednom případě povolený limit překročen. Omezené používání chlórovaných pesticidů a PCB se promítá v rychlejším poklesu hladin reziduí těchto látek u domácích prasat než u prasat divokých.

nejvyšší povolená množství reziduí; maso divokých prasat

Důvodem pro široké používání chlórovaných pesticidů v zemědělství v minulých letech byla jejich účinnost a snadnost jejich všestranné aplikace. Teprve později poznané negativní účinky na životní prostředí, problém reziduí a často snižující se účinnost a tím i nutnost zvyšovat dávky účinné látky způsobily, že jejich používání začalo být v jednotlivých zemích omezováno a později i zakázáno. Tak u nás byl v roce 1974 vyřazen z používání insekticid DDT a v roce 1978 fungicid HCB. Na druhé straně lindan (γ -HCH) a endosulfan se k ochraně před škůdci v omezeném rozsahu používají i nadále.

Ke skupině chlórovaných pesticidů se řadí polychlórované bifenyly (PCB), které svým chemickým složením rovněž patří mezi chlórované uhlovodíky, nepoužívají se však proti škůdcům, ale patří mezi průmyslové polutanty. Původně velmi široké použití PCB v různých průmyslových odvětvích je v mnoha zemích, i u nás, silně omezeno a rovněž výroba

čs. komerčních směsí PCB s názvem Delor byla začátkem roku 1984 zastavena. Důvodem pro toto omezení byla extrémně vysoká chemická odolnost PCB a jejich velmi nesnadné biologické odbourávání, jakož i tendence kumulovat se v tukových tkáních.

V předložené práci jsou shrnuty a zhodnoceny výsledky stanovení reziduí chlórovaných pesticidů a PCB ve vzorcích šunek a vepřového masa, zasílaných na SVÚ Jihlava na vyšetření veterinárně hygienickou službou převážně z exportních závodů masného průmyslu v roce 1986. Tyto výsledky jsou porovnány s výsledky zjištěnými od roku 1971 a dále s návrhem Směrnice MZD, ČSR, kterými se doplňují a upřesňují Směrnice č. 50 MZd, ČSR z roku 1978.

Jsou zde srovnány i výsledky vyšetření masa domácích prasat z velkochovů z okresu Jindřichův Hradec s vyšetřeními masa divočáků (černé zvěře), ulovených v sousedícím okrese Jihlava.

Stanovením hladin reziduí chlórovaných pesticidů v potravinách a v životním prostředí v ČSSR se zabývali různí autoři. Údajů o reziduích chlórovaných uhlovodíků v masu a v masných výrobcích je však méně. Většina starších prací, zhruba do roku 1980, ale i některé práce novější si všimají pouze reziduí chlórovaných pesticidů a údaje o reziduích PCB chybějí (Kredl a Breyl, 1980; Bartoníček, 1981; Mikulík a Vávrová, 1983; Bartoníček aj., 1984).

Od počátku 80. let získala na důležitosti otázka reziduí PCB v potravinách a v životním prostředí. V posledním období udávají autoři vedle hladin reziduí chlórovaných pesticidů i hladiny PCB a většina z nich konstatuje, že rezidua PCB se vyskytují téměř ve všech potravinách a surovinách živočišného původu (Vávrová, 1983; Breyl a Kredl, 1983; Kredl aj., 1984; Mikulík a Vávrová, 1986).

Otázkou reziduí chlórovaných pesticidů a PCB v orgánech a tkáních lovných a volně žijících zvířat se u nás zabývali Kredl a Breyl (1981), ale neuvádějí hladiny reziduí v masu divokých prasat.

Ze zahraničních autorů konstatovali Stojanovič aj. (1983), že v NSR je maso volně žijících zvířat rezidui chlórovaných pesticidů a PCB vcelku zatíženo více než maso zvířat domácích.

Nejvyšší povolená množství reziduí chlórovaných pesticidů překračuje v NSR u černé zvěře 7,3 % vyšetřených vzorků (Frese aj., 1978).

Tab. I udává příklady nejvyšší přípustných množství reziduí chlórovaných uhlovodíků v masu v některých státech.

MATERIÁL A METODY

Vyšetřovaným materiálem byly vzorky vepřového masa a šunek zasílané exportními závody masného průmyslu z celé ČSR na zjištění hladin reziduí cizorodých látek před odesláním zásilek do zahraničí. Šlo především o exportní masokombináty Studená a Planá nad Lužnicí.

V roce 1985 a 1986 jsme vyšetřovali vzorky masa divokých prasat různých hmotnostních a věkových kategorií, ulovených na území okresu Jihlava.

K izolaci reziduí chlórovaných pesticidů z biologického materiálu a k čištění extraktů jsme v letech 1971 až 1974 použili metody, kterou uvedli Szokolay aj. (1970), v dalších letech metody, kterou popsali Hruška a Kociánová (1974) s rozšířením na rezidua PCB podle Kredla a Breyla (1984). Princip izolace reziduí spočívá v extrakci tuku ze vzorků společně s rezidui lipofilních pesticidů

I. Maximální limity reziduí chlоровaných pesticidů v mase v různých zemích (v mg.kg⁻¹ tuku) — The maximum limits of chlorinated pesticide residues in meat permitted in various countries (mg per kg fat)

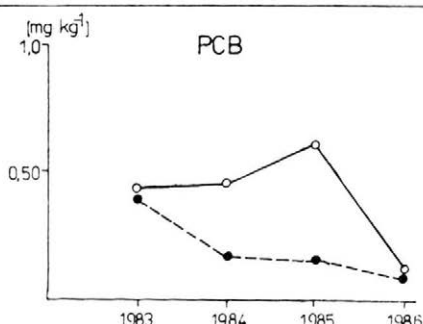
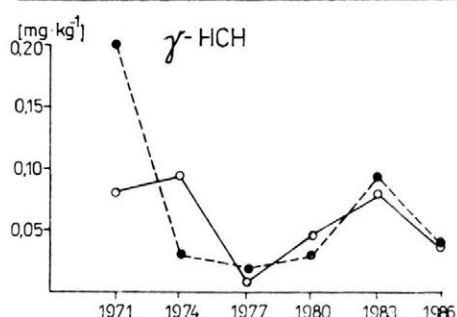
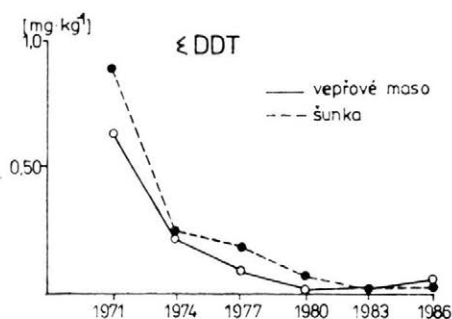
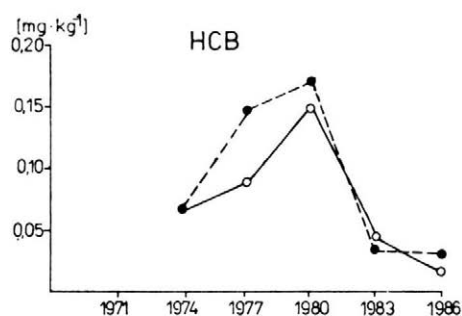
Pesticid	ČSSR (návrh) 1987	USA 1986	NSR 1982	EHS od 1988
HCB	0,5	0,5	0,5	0,5
Izoméry HCH	0,3	0,3	0,3	0,3 α — 0,2 β — 0,1
Lindan	2,0 drůbeží 0,7	hovězí koňské skopové 7,0 drůbeží vepřové 4,0	2,0 drůbeží 0,7 zvěřina 0,7	2,0
Σ DDT	1,0	5,0	3,0	1,0
PCB	vepřové 1,0 hovězí 1,5 drůbeží 1,5	3,0	—	—
Heptachlór, heptachlóreoxid	—	0,3	0,2	0,2
Aldrin a dieldrin společně jako dieldrin	0,2*	0,3	0,2	0,2
Endosulfan a metabol.	—	0,2	—	—
Endrin	—	0,2	—	—
Metoxychlór	—	3,0	3,0	—
Chlordan	—	0,3	—	0,05

* — dovážené maso

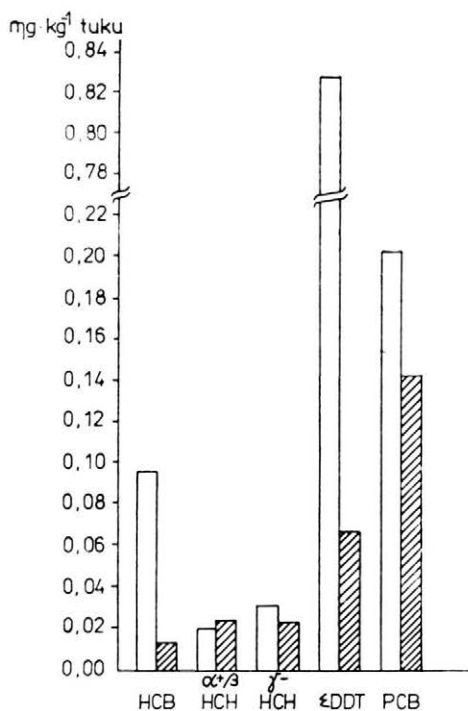
a PCB směsí aceton-petroléter a v odstranění tuku a koextrahovaných znečištění na sloupci florisilu.

Pro analýzy byl použit od roku 1970 plynový chromatograf Varian Aerograph model 1740 s detektorem elektronového zachytu, od roku 1976 i plynový chromatograf Varian Aerograph 2740. V pozdějších letech se analýzy dělaly na přístrojích Hewlett Packard 5730A a Hewlett Packard 5880A, vždy s detektorem elektronového zachytu. Skleněné kolony o délce pět stop (152 cm) s náplní 1,5% OV-17 + 1,95% QF-1 na Chromosorbu W, 80 100 mesh a tytéž kolony s náplní 10% OV-101 na Gas Chrom Q 80 100 mesh.

Bylo použito metody absolutní kalibrace. Standardy chlоровaných pesticidů pocházely od fy Polyscience Corporation, Illinois, USA. Jako standard PCB byl použit Aroclor 1260 od fy Supelco Inc., USA.



1. Průměrné hladiny reziduí chlорованých pesticidů a polychlorovaných bifenyků v letech 1971 až 1986 — The average contents of the residues of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls recorded in 1971 to 1986



2. Průměrné hladiny reziduí chlорованých uhlovodíků v mase divokých prasat a prasat domácích z velkochovů, vyšetřených v letech 1985 a 1986 — The average contents of the residues of chlorinated carbohydrates in the meat of wild boars and in the meat of domestic pigs kept in large herds and examined in 1985 and 1986

□ prasata divoká $n = 79$
 ▨ prasata domácí $n = 746$

II. Přehled výsledků vyšetření vzorků šunek a vepřového masa, analyzovaných v roce 1986 — A survey of the results of the examination of ham and pork samples analyzed in 1986

Látka	Vzorek	n	mg . kg ⁻¹ tuku				Do 33 % limitu		34 – 100 % limitu		Nad limit	
			průměr	min.	max.	limit	počet	%	počet	%	počet	%
HCB	šunka	682	0,030	neg.	0,535	0,5	676	99,1	5	0,7	1	0,2
	vepřové maso	926	0,017	neg.	0,410	0,5	922	99,6	4	0,4	0	0
$\alpha + \beta$ – HCH	šunka	682	0,022	neg.	0,426	0,3	668	97,9	13	1,9	1	0,2
	vepřové maso	926	0,019	neg.	0,300	0,3	906	97,8	20	2,2	0	0
Lindan	šunka	682	0,037	neg.	1,733	2,0	673	98,7	9	1,3	0	0
	vepřové maso	926	0,035	neg.	2,421	2,0	921	99,5	2	0,2	3	0,3
Σ DDT	šunka	682	0,036	neg.	0,219	2,0	682	100,0	0	0	0	0
	vepřové maso	926	0,059	neg.	0,309	2,0	926	100,0	0	0	0	0
PCB	šunka	682	0,075	neg.	1,455	3,0	677	99,3	5	0,7	0	0
	vepřové maso	926	0,107	neg.	2,623	3,0	919	99,2	7	0,8	0	0
Výsledky analýz reziduí PCB v roce 1983 (v mg . kg ⁻¹ tuku)												
PCB	šunka	388	0,381	stopy	20,075	3,0	361	93,0	17	4,3	10	2,7
	vepřové maso	452	0,429	stopy	17,200	3,0	424	93,8	13	2,8	15	3,4

VÝSLEDKY

Přehled průměrných hladin reziduí chlórovaných uhlovodíků ve vepřovém mase a šunkách pocházejících z území ČSR v tříletých intervalech let 1971 až 1986 udává obr. 1.

Přehled výsledků vyšetření vzorků vepřového masa a šunek analyzovaných na SVÚ Jihlava v roce 1986 je v tab. II. Pro srovnání jsou zde uvedeny i výsledky analýzy reziduí PCB z roku 1983.

V obr. 2 jsou znázorněny průměrné hladiny reziduí chlórovaných uhlovodíků ve vzorcích masa divokých prasat ulovených na území okresu Jihlava spolu s průměrnými hladinami reziduí nalezenými ve stejném období ve vzorcích vepřového masa domácích prasat z nasávací oblasti masokombinátu ve Studené (okres Jindřichův Hradec, který sousedí s okresem Jihlava).

DISKUSE

Státní veterinární ústav v Jihlavě se zabývá sledováním hladin reziduí chlórovaných pesticidů v potravinách již od roku 1971. Od počátku 80. let jsou stanovována i rezidua PCB. V posledních letech podstatně stoupl počet vyšetřovaných vzorků masa a masných výrobků (šunek) v souvislosti s požadavky exportu.

Z obr. 1 je ve sledovaném období patrný celkový úbytek reziduí Σ DDT, dále zvyšování reziduí HCB s kulminací v roce 1980 a s následným poklesem, nevýrazné kolísání hladin lindanu a poměrně vysoké zjištěné hladiny PCB po zahájení jejich sledování počátkem 80. let s výrazným poklesem v dalším období. Prudší pokles hladin reziduí PCB u šunek, patrný z obr. 1, ve srovnání s průměrnými hladinami těchto reziduí u vepřového masa je ovlivněn tím, že vzorky vepřového masa přesahující hladinu reziduí PCB = $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku byly vyloučeny z výroby šunek a naopak, při zvýšených nálezech reziduí ve vepřovém mase byly odebrány další kontrolní vzorky z téže denní porážky.

Obr. 1 v podstatě odráží účinnost jednotlivých legislativních opatření omezujících používání jednotlivých chlórovaných pesticidů ve sledovaném období, tj. omezení používání DDT počátkem 70. let až do jeho úplného vyloučení v roce 1974, vyloučení přípravků s HCB z užívání v roce 1978, kolísání hladin lindanu, který nemá velkou tendenci ke kumulování a je používán stále omezeněji, i snížení průměrných hladin reziduí průmyslového polutantu PCB po zákazu jeho výroby počátkem roku 1984.

Současnou situaci na úseku reziduí chlórovaných pesticidů a PCB ve vepřovém mase a v šunkách odráží tab. II. Nejvyšší přípustná množství uvedená v této tabulce pro lindan a DDT byla převzata ze Směrnice č. 50/78.; pro chlórované uhlovodíky, jejichž tolerance tam není uvedena, tj. pro HCB, $\alpha + \beta$ -HCH a pro PCB, jsme limity převzali z předpisů USA, kam směřuje export většiny námi vyšetřených vzorků.

Z tab. II je zřejmé, že v roce 1986 byly tolerance reziduí námi sledovaných chlórovaných pesticidů a PCB překročeny pouze v nízkém procentu vyšetřených vzorků (celkem u 0,4 % šunek a u 0,3 % vepřového masa). Potěšitelné je, že se ani v jednom případě nejednalo o rezidua

PCB, která jsou v posledních letech nejintenzivněji sledována. Ve srovnání s nálezy reziduí v roce 1983 znamenají průměrné hladiny reziduí PCB v roce 1986 pokles zhruba o 80 % u šunek a o 75 % u vepřového masa. Souvisí to jednak se zastavením výroby směsí polychlórovaných bifenylů (Delorů) u nás v roce 1984, jednak s omezeným používáním nátěrových materiálů obsahujících PCB v potravinářském a krmivářském průmyslu. Přispěla k tomu i celková lepší informovanost osob pracujících s PCB o jejich perzistenci, o problémech reziduí atd.

V návrhu Směrnic MZd. ČSR, kterými se doplňují a upřesňují Směrnice č. 50 MZd. ČSR/78, je pro vepřové maso uvedena hodnota $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku, zatímco v tab. II jsme vycházeli z hodnoty $3,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku, platné v USA. Jak je zřejmé z této tabulky, navrhovaný limit $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku by v roce 1986 překročilo pouze 0,7 % šunek a 0,8 % vzorků vepřového masa. Lze tedy považovat navrhované nejvyšší množství reziduí PCB na hladině $1,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku za přiměřené.

Porovnáme-li hladiny reziduí sledovaných látek v masě divokých prasat s výsledky vyšetření vzorků prasat domácích, lze konstatovat, že vzorky odebrané z divokých prasat jsou kontaminovanější. Tento nálezu odpovídá situace u lovné zvěře v NSR, jak ji zhodnotili Stojanovič aj. (1983), kteří rovněž uvádějí, že maso volně žijících zvířat je reziduí chlórovaných pesticidů a PCB zatíženo více než maso zvířat domácích.

Námi zjištěné průměrné hladiny reziduí u divokých prasat jsou u HCB $7,7 \times$, u lindanu $1,3 \times$, u Σ DDT $12,55 \times$ a u PCB $1,4 \times$ vyšší než jsou průměrné hladiny reziduí nalezené u prasat domácích, pocházejících z velkochovů z přibližně stejné oblasti. Pouze průměrné hladiny reziduí $\alpha + \beta$ -HCH byly mírně vyšší u prasat domácích ($1,2 \times$).

Omezené používání chlórovaných pesticidů a PCB se v poklesu hladin reziduí těchto látek u domácích zvířat promítá rychleji než u zvířat volně žijících. Lze to vysvětlit perzistencí těchto látek v přírodě, kde volně žijící zvířata žijí a kde jsou, i když ve stále snižující se míře, vystavena možnosti kontaminace.

Ukazuje to i příklad reziduí Σ DDT: zjistili jsme, že 12,7 % vzorků pocházejících z divokých prasat překročilo nejvyšší povolené množství $2,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ tuku. Je to zjištění dosti překvapující, protože plošné používání DDT bylo u nás zastaveno již v roce 1974. Je ovšem známo, že rezidua DDT perzistují v prostředí mnoho let (Wolf, 1983). Kromě DDT jsou u divokých prasat hladiny všech ostatních reziduí chlórovaných uhlovodíků v povolených limitech. Pokud bychom nalezené hladiny reziduí Σ DDT u divokých prasat posuzovali z hlediska tolerancí USA ($5,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), vyhovovaly by všechny vzorky, z hlediska tolerancí NSR ($3,0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) by nevyhovoval pouze jeden vzorek (1,3 %).

Je zřejmé, že přes pozitivní tendenci ke snižování průměrných hladin reziduí chlórovaných pesticidů a PCB ve vyšetřovaných vzorcích by bylo předčasné považovat jejich sledování v potravinách všeobecně za překonané a zbytečné.

Literatura

- BARTONÍČEK, F.: Rezidua pesticidů v živočišných potravinách. Veterinářství, 31, 1981, č. 9, s. 413-415.
- BARTONÍČEK, F. — KREDL, F. — LÁT, J.: Rezidua HCB v některých druzích biologického materiálu. In: Sbor. přednášek z VI. odbor. semináře: Pesticidy v životním prostředí. Praha, 27.—28. 11. 1984.
- BREYL, I. — KREDL, F.: Chlorované uhlovodíky v mase a v masných výrobcích. Prům. Potrav., 34, 1983, č. 3, s. 124-126.
- Compound evaluation and analytical capability. A. Res. Plan, USDA — FSIS, 1986.
- FRESE, E. — BRÖMEL, J. — ZETTL, K.: Untersuchungen über Rückstandbelastung einheimischer Wildarten durch einige chlorierte Kohlenwasserstoffe. Fleischwirtschaft, 58, 1978, č. 10, s. 1691-1694.
- HRUŠKA, J. — KOCIÁNOVÁ, M.: Stanovení reziduí chlорованých pesticidů v potravinách, biologickém materiálu a vodě metodou plynové chromatografie. České Budějovice, KHES 1974.
- KREDL, F. — BREYL, I.: Hladiny reziduí chlорованých pesticidů ve vepřovém mase, masných výrobcích a v tukové tkáni vepřů v letech 1971—1979. [Ústavní výzkumná práce.] Praha, ÚSVÚ 1980.
- KREDL, F. — BREYL, I.: Rezidua chlорованých pesticidů v orgánech volně žijící zvěře. Folia venator., 1981, č. 11-12, s. 143-161.
- KREDL, F. — BREYL, I.: Rychlá provozní metoda na stanovení PCB v mase a masných výrobcích. Acta epidem. microbiol., 1984, č. 10, příloha.
- KREDL, F. — FROLÍKOVÁ, N. — JIRÁSKOVÁ, M.: Stanovení reziduí PCB v některých druzích biologického materiálu. In: Sbor. přednášek z VI. odbor. semináře: Pesticidy v životním prostředí. Praha, 27.—28. 11. 1984.
- MIKULÍK, A. — VÁVROVÁ, M.: Rezidua chlорованých uhlovodíků ve vepřovém sádle v několikaletém časovém odstupu. Čs. Hyg., 28, 1983, č. 4, s. 208-213.
- Návrh směrnic MZd. ČSR, kterým se mění a doplňují směrnice MZd. ČSR č. 50/1978, Hyg. předpisy č. 63/1984 a Hyg. předpisy č. 69/1986.
- Směrnice o přípustné hranici zbytků látek proti škůdcům v potravinách živočišného původu. 86 363 EGW.
- STOJANOVIC, V. — BRUNN, H. — FLEMMING, R.: Untersuchungen auf chlorierte Kohlenwasserstoffe in Haar- und Federwild im Rahmen der amtlichen Lebensmittelüberwachung. Arch. Lebensm. Hyg., 34, 1983, č. 6, s. 142-144.
- SZOKOLAY, A. — MAĐARIČ, A. — UHNÁK, J. — SACKMAUEROVÁ, M.: Univerzálna metóda identifikácie a stanovenia reziduí CHU v potravinách rastlinného a živočišného pôvodu, v krmivách a v pôde. Acta hyg. (Praha), příloha č. 2/1970.
- SZOKOLAY, A. — UHNÁK, J. — MAHELOVÁ, E. — VENINGEROVÁ, M.: Kontaminácia potravinového reťazca rezíduami HCB a její odraz expozíciou človeka. Českoslov. Hyg., 26, 1981, č. 8, s. 393-396.
- VÁVROVÁ, M.: PCB v biologickém materiálu. Prům. Potrav., 34, 1983, č. 3, s. 122-124.
- WOLF, A.: Cizorodé látky v poživatinách. Prům. Potrav., 34, 1983, č. 7, s. 375-378.

Došlo dne 1. 6. 1987

КРЕДЛ, Ф. — СВОБОДНИК, Я. (Государственный ветеринарный институт, Йиглава): Остатки хлорированных пестицидов и полихлорированных биофенилов в свинине и ветчине за последние годы и в настоящее время. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 175-184.

На содержание хлорированных пестицидов и полихлорированных бифенилов (PCB) было в 1986 году исследовано при помощи метода газовой хроматографии с ЕС детектором 682 образца ветчины и 926 образцов свинины, происходящих в большинстве случаев из экспортных заводов мясной промышленности. Тolerантность остатков хлорированных пестицидов была в этом году превышена у 0,4% ветчины и у 0,3% сви-

нины. Лимит РСВ предлагаемый для свинины (1,0 мг/кг жира) превысило 0,7% ветчины и 0,8% проб свинины, что означает значительное снижение остатков РСВ в отличие от 1983 года, когда эту границу превысило 7,0% ветчины и 6,2% проб свинины. Это снижение вытекает из действительности, что у нас производство РСВ было остановлено, что было ограничено их применение и что личности работающие с препаратами содержащими РСВ были лучше информированы об их постоянности, проблемах остатков и т. д. Мясо диких свиней является более загрязненным чем мясо домашних свиней из крупных разведений. Касается это главным образом остатков суммы ДДТ (12,7% проб мяса диких кабанов превысило лимит 2,0 мг/кг жира), но и остатков НСВ, линдана и РСВ. У следующих приведенных хлорированных углеводородов все-таки ни в одном из случаев не был допустимый лимит превышен. Ограниченное применение хлорированных пестицидов и РСВ проходит в более быстром понижении уровней остатков этих веществ у домашних свиней, чем у диких свиней.

самое большое количество допустимых остатков; мясо диких свиней

KREDL, F. — SVOBODNÍK, J. (State Veterinary Institute, Jihlava): *The Residues of Chlorinated Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Pork and Ham Samples in the Last Years and at Present*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 175-184.

The contents of the residues of chlorinated pesticides and polychlorinated biphenyls (PCB) were investigated in 682 samples of ham and 926 samples of pork that were collected in the export meat plants. The investigation, based on the gas chromatography method with an EC detector, was performed in 1986. The tolerance of the residues of chlorinated pesticides was exceeded in 0,4% of the hams and 0,3% of the pork samples in that year. The PCB limit, proposed for pork (1,0 mg per kg of fat) was exceeded in 0,7% of the hams and 0,8% of pork samples; it can be seen from these data that the residue contents were considerably reduced in comparison with the year 1983 when this limit was exceeded in 7,0% of the hams and 6,2% of the pork samples. This decrease is due to the fact that the production of PCB was stopped, their use has been restricted, and the persons working with preparations containing PCB have been better informed about the chemical persistence, problems of residues and the like. The meat of wild boars is more contaminated than is the meat of the domestic pigs reared in large herds; this applies, first of all, to the residues of the DDT series (12,7% of the meat samples of the wild boars exceeded the limit of 2,0 mg per kg of fat) and also to the residues of HCB, lindane, and PCB. As for the PCB residues, the maximum tolerated residue content was never exceeded. A decrease in the contents of chlorinated pesticide and PCB residues resulting from the limited use of these chemicals is faster in the meat of the domestic pigs than in that of the wild boars.

highest tolerated amounts of residues; meat of wild boars

KREDL, F. — SVOBODNÍK, J. (Staatliches veterinärmedizinisches Institut, Jihlava): *Residuen chlorierter Pestizide und polychlorierter Biphenyle im Schweinefleisch und in Schinken in früheren Jahren und heute*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 175-184.

Im Jahre 1986 wurden mittels der Methode der Gaschromatographie mit EC-Detektor 682 Schinken- und 926 Schweinefleischproben, die überwiegend aus für den Export liefernden Betrieben der Fleischindustrie kamen, auf den Gehalt an Residuen von chlorierten Pestiziden und polychlorierten Biphenylen (PCB) untersucht. Die Residuentoleranz für chlorierte Pestizide wurde im angeführten Jahr bei 0,4% der Schinken und 0,3% des Schweinefleisches überschritten. Das für PCB beantragte Limit für Schweinefleisch (1,0 mg.kg⁻¹ Fett) überschritten 0,7% der Schinken- und 0,8% der Schweinefleischproben, was eine beträchtliche Herabsetzung der PCB-Residuen gegenüber 1983 bedeutet, wo 7,0% der Schinken und 6,2% der Schweinefleischproben über diesem Grenzwert lagen. Dieser Rückgang ergibt sich aus der Tatsache, daß bei uns die Herstellung von PCB eingestellt wurde, daß deren Anwendung stark reduziert wurde und daß die mit PCB-haltigen Mitteln arbeitenden Personen eingehender informiert wurden über die Persistenz solcher Stoffe, über Probleme der Residuen usw. Das von Wildschweinen stammende Fleisch ist in einem höheren Grad kontaminiert als das Fleisch der

Hausschweine aus Großproduktionsanlagen. Dies bezieht sich insbesondere auf Residuen der Summe des DDT (12,7 % der Fleischproben von Wildschweinen überschritten das Limit von 2,0 mg . kg⁻¹ Fett), ebenso jedoch auch auf HCB-, Lindan- und PCB-Residuen. Bei den letztgenannten chlorierten Kohlenwasserstoffen wurde jedoch das zugelassene Limit in keinem einzigen Fall überschritten. Die reduzierte Anwendung chlorierter Pestizide und PCB kommt in einer schnelleren Senkung der Residuenspiegel dieser Stoffe bei Hausschweinen als bei Wildschweinen zum Ausdruck.

maximal zugelassene Residuenmenge; Fleisch der Wildschweine

Adresa autorů:

RNDr. František Kredl, ing. Jan Svobodník, Státní veterinární ústav, Rantířovská 93, 586 05 Jihlava

ENZYMOVÁ AKTIVITA POD VLIVEM VÝCVIKOVÉ ZÁTĚŽE SLUŽEBNÍHO PSA

J. Konrád, M. Cupák, J. Hrušovský, S. Husák, K. Šmíd

KONRÁD, J. — CUPÁK, M. — HRUŠOVSKÝ, J. — HUSÁK, S. — ŠMÍD, K. (Vysoká škola veterinární, Brno; Vojenský veterinární doškolovací a výzkumný ústav, Košice): *Enzymová aktivita pod vlivem výcvikové zátěže služebního psa*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 185-191.

Studovali jsme dynamiku aktivity pěti druhů enzymů — asparátaminotransferázy (AST), alaninaminotransferázy (ALT), laktátdehydrogenázy (LD), termostabilní frakce laktátdehydrogenázy (LD-1), alkalické fosfatázy (ALP) — u 30 psů samčího pohlaví, rozdělených do dvou věkových kategorií, v průběhu dlouhodobého výcviku v trvání 130 dnů. Obě transaminázy vykazují charakteristickou dynamiku aktivity s počáteční depresí mezi 30. až 40. dnem výcviku, s jejím postupným pozvolným zvyšováním u AST a prudkým u ALT až do konce výcviku. Statisticky významnou dynamiku sleduje LD s trvalým poklesem aktivity u obou věkových skupin psů. LD-1 je charakteristická depresí aktivity až do 70. dne výcviku, pak zvýšenou aktivitou až do signifikantní elevace ke konci výcviku. Aktivita ALP vykazuje pravidelné kolísání, ale stále signifikantně pod hranici výchozích hodnot. Studované aktivity enzymů lze využít jako dílčích testů při vědeckém řízení výcviku ve vztahu k fyziologickým a patofyziologickým procesům zatěžovaného psa.

klinická enzymologie; fyziologie výcviku; veterinární kynologie

Klinická veterinární enzymologie zaznamenala již řadu poznatků důležitých pro klinickou diagnostiku. Bylo jich však využito i pro studium různých zátěžových a adaptačních procesů u zvířat, zejména u koní. Přitom se využívalo i zkušeností získaných studiem enzymologie u lidí. Velmi skromné jsou však poznatky z enzymologie psa, především pokud se týká vlivu fyzické zátěže a její enzymatické odezvy.

V roce 1955 uveřejnil Bedrak své poznatky o aktivitě některých enzymů na tělesnou zátěž u psa za různých teplotních a vlhkostních podmínek vnějšího prostředí. Výsledky prokázaly výraznější aktivity u psů neaklimatizovaných, zvláště pokud se týká AST a ALT. Zvýšenou sérovou aldolázu u psů vedených na vodítku i běžících za autem rychlostí 30 km za hodinu uvedl Schleicher (1963). Protichůdné výsledky, rovněž s rozdílnou pohybovou zátěží, zaznamenal Schulze (1967).

Početné jsou poznatky získané sledováním enzymové aktivity u koní. Již v roce 1960 prokázali Cornelius aj. (1963) u koní v tréninku vyšší hodnoty aktivity AST než u koní intaktních. Aktivitu enzymů specifických pro svalstvo (jako je AST, CPK a LD) dlouhodobě sledovali Riethmüller a Wels (1972). Prokázali, že se po sedmiměsíčním tréninku zvýšila o 25 a 30 %. Jeffcott (1974) zjistil u koní v prv-

ních dvou týdnech tréninku dvojnásobné až trojnásobné zvýšení klidových hodnot AST, které se pak za dva až tři měsíce vrací k výchozím hodnotám. U trénovaných koní jsou však výchozí hodnoty AST vždy vyšší než u koní netrénovaných.

Bohaté zkušenosti se zvýšením aktivit AST, ALT, LD jsou známy u lidí, kteří pracovali (Otto aj., 1964), nebo po zatížení na ergometru (Loll a Hilscher, 1958), proti výsledkům u osob bez pracovního zatížení a u osob netrénovaných.

MATERIÁL A METODY

Do sledování bylo zařazeno 30 psů samčího pohlaví ve věku 13 měsíců až 5 roků. Výcvik probíhal po dobu 130 dnů, kdy bylo odebráno celkem osm krevních vzorků. První vzorek, odebraný před zahájením výcviku, sloužil jako kontrolní. Další odběry se uskutečnily v intervalech od zahájení výcviku — 14, 30, 38, 51, 71, 93 a 120 dnů (dny odběrů jsou zachyceny v obr.).

Vzorky krve byly odebírány vždy v dopoledních hodinách, po ranním nakrmení.

CHARAKTERISTIKA VÝCVIKOVÉ ZÁTĚŽE

V úvodní části pokusu nebyli psi vystaveni zvláštní fyzické zátěži. Seznamovali se s prostředím, byli voděni, navazovali kontakt s psovodem, hráli si. Toto období trvalo 14 dnů (2. odběr). Vlastní výcvik s prvky poslušnosti s průměrnou intenzitou fyzické a psychické zátěže trval tři týdny (3. a 4. odběr). V šestém až 15. týdnu nastoupily speciální výcvikové disciplíny, jako je rozvíjení zloby, nedůvěry, odvahy, zadržování, odvolání, později i práce stopařská. Toto období je zátěžově hodnoceno jako průměrné až nadprůměrné (5. až 7. odběr). Následoval komplexní maximálně intenzivní výcvik a příprava ke zkouškám v trvání 14 dnů (8. odběr).

Do sledování byly zařazeny aktivity transamináz AST a ALT, zjišťované metodou podle Sevelý a Továrka (1959), stejně jako aktivita LD. Laktátdehydrogenáza termostabilní (LD-1) byla stanovována jako inaktivní jaterní frakce při teplotě 56 °C po dobu 30 minut. Alkalická fosfatáza (ALP) byla stanovována pomocí Biotestu Lachema.

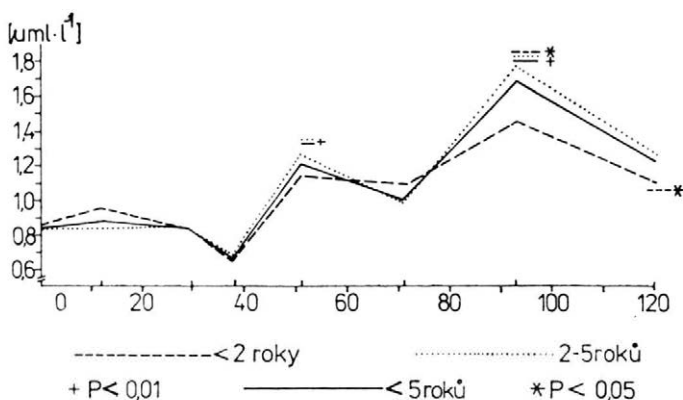
VÝSLEDKY

Výsledky jsou graficky zpracovány v obr. 1—5.

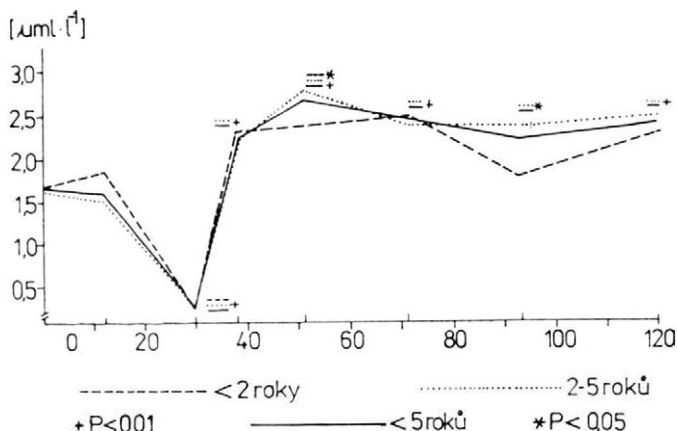
Transamináza — AST si udržuje až do 30. dne výcviku výchozí hodnoty. Ve 38. dnu dochází k nesignifikantnímu poklesu. Pak nastupuje zvyšování aktivity a v 93 dnech výcviku je u psů do dvou let věku toto zvýšení signifikantní ($P < 0,05$) a u psů starších (dva až pět let) je dokonce vysoce významné ($P < 0,01$). Postupné snižování do 120. dne výcviku pro obě věkové kategorie psů je stále nad úrovní výchozích hodnot (obr. 1).

Transamináza — ALT nemá tak charakteristickou křivku vzestupu jako AST. Již ve 14 dnech od zahájení výcviku nastupuje prudký pokles aktivity s maximem ve 30 dnech u obou věkových kategorií psů. Od tohoto období však aktivita výrazně stoupá. Vzestup je pro psy starší věkové kategorie již ve 38. dnu výcviku vysoce průkazný, s maximem v 50. dnu, a potom se udržuje trvale až do 120. dne na vysokém stupni aktivity. U psů do dvou let věku nejsou však tyto hodnoty signifikantní, i když jsou stále vysoké (obr. 2).

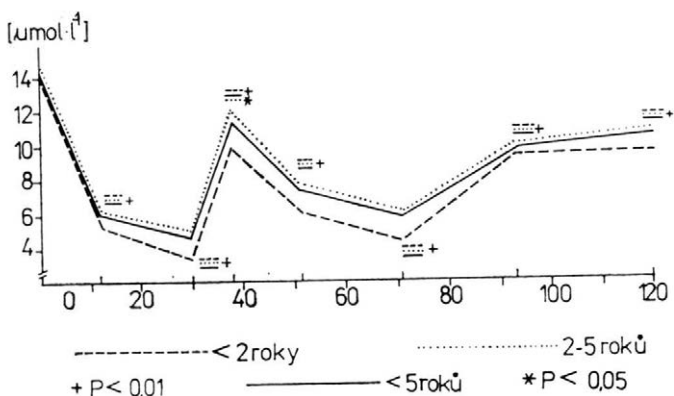
1. Dynamika aktivit asparátaminotransferázy (AST) v průběhu dlouhodobého výcviku psa — The changes in aspartate aminotransferase (AST) activities in the course of long-continued training of a dog



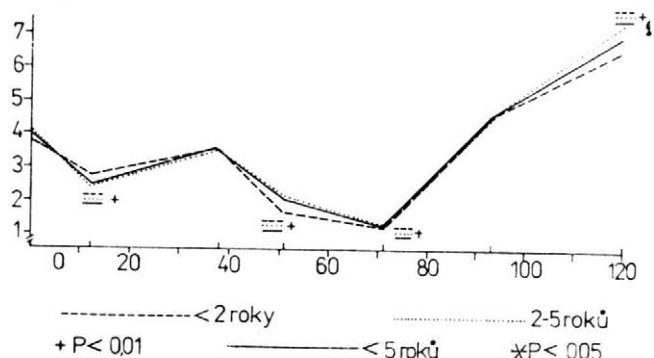
2. Dynamika aktivit alaninaminotransferázy (ALT) v průběhu dlouhodobého výcviku psa — The changes in alanine aminotransferase (ALT) activities in the course of long-continued training of a dog



3. Hodnoty laktátdehydrogenázy (LD) v průběhu dlouhodobého výcviku psa — The values of lactate dehydrogenase (LD) in the course of long-continued training of a dog



[$\mu\text{mol l}^{-1}$]



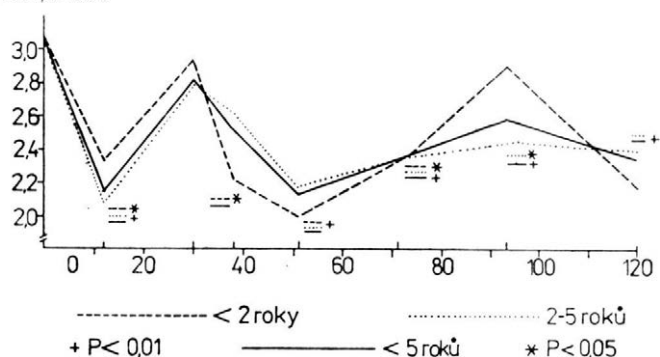
4. Hodnoty laktátdehydrogenázy — termostabilní frakce (LD-1) v průběhu dlouhodobého výcviku psa — The values of lactate dehydrogenase — thermally stable fraction (LD-1) in the course of long-continued training of a dog

Laktikodehydrogenáza — LD zaznamenává téměř po celou dobu výcviku signifikantní pokles aktivity, s prudkou depresí již od 14 dnů u obou věkových kategorií, s nejnižšími hodnotami ve 30 dnech výcviku. Pak následuje určitý vzestup, ale stále v průkazných hodnotách pod úrovní výchozí aktivity. Druhá nejnižší deprese aktivity byla zjištěna v 70 dnech výcviku. V porovnání s aktivitou obou transamináz vykazuje LD výraznou trvalou depresi (obr. 3).

Laktikodehydrogenáza — LD-1 termostabilní frakce vykazuje až do 70. dne výcviku hodnoty pod výchozí aktivity, již od 14. dne je snížení statisticky vysoce průkazné. Při šestém odběru krevních vzorků, tj. od 71. dne výcviku, se zjišťuje vzestup její aktivity s vysoce průkaznými hodnotami ve 120. dnu, a to pro obě věkové kategorie psů (obr. 4).

Alkalická fosfatáza — ALP má obdobný průběh jako aktivita LD, i když ne zcela jednoznačný. Přesto se u starších psů zjišťuje v celém průběhu výcviku snížení její aktivity, kromě období kolem 30. dne. Pokles se týká obou věkových skupin psů. Nejvyšší pokles aktivity zjišťujeme v 50. dnu výcviku, kdy je snížení vysoce průkazné. Toto snížení si stále udržují psi starší, a to do 120. dne výcviku. Potom je sledují i psi do dvou let věku, kteří v 93 dnech výcviku vykázali určité zvýšení aktivity, nedosahující však výchozích hodnot (obr. 5).

BL./ $\mu\text{mol l}^{-1}$



5. Dynamika aktivity alkalické fosfatázy v průběhu dlouhodobého výcviku psa — The changes in alkaline phosphatase activity in the course of long-continued training of a dog

Při výzkumu vlivů dlouhodobého fyzického a psychického zatížení, tak jak je charakterizuje výcvik služebního psa pro potřeby strážní a hlídkové služby, na vnitřní prostředí psa, byla studována také aktivita pěti druhů enzymů AST, ALT, LD, LD-1, ALP.

Enzymová aktivita obou transamináz vykazuje na počátku výcviku jen nepatrné změny. Potom však nastupuje trvalé zvyšování aktivity, což prokazuje u psů i po krátkodobé zátěži Bedrak (1955). V porovnání s tímto autorem jsme však nezaznamenali zvýšení aktivity LD, ale naopak její trvalý pokles po celou dobu výcviku. Zvýšenou aktivitu LD neuvádí ani Schleicher (1966). Vysvětlení tohoto kontrastu vidíme především ve skutečnosti, že uvedení autoři posuzovali jen krátkodobou, momentální zátěž, zatímco naši psi byli sledováni dlouhodobě.

Obdobně jsou naše výsledky s hodnotami aktivit, zvláště transamináz, jak je uvádí u koní Jeffcott (1974). Rovněž pokud se týká izoenzymu LD-1 jsou naše pozorování velmi podobná těm, která uvádějí Quya a Snow (1977): v první polovině tréninku dochází k její depresi a teprve v pozdější fázi výcviku k jejímu prudkému vzestupu. Tento vzestup je považován za důsledek výraznějšího hypoxického stavu zatěžovaného svalstva.

Podobně u netrénovaných lidí zjišťovali Otto aj. (1964) pokles aktivity AST i ALT, později — po pracovní zátěži na ergometru — její výrazné zvýšení a náviat k normě. Tyto poznatky se shodují s našimi výsledky.

Při posuzování zátěže koní a trénovaných i netrénovaných lidí vycházíme samozřejmě pouze z funkčního stavu koní i lidí před výcvikem a po něm. S tím spojená zátěž je obdobou nastupující zátěže u psů zastavených do výcviku. Přitom míra zátěže je dána jen kvantitativní obdobou pracovního a výcvikového zatížení.

Praktické využití našich výsledků lze očekávat především u těch enzymatických aktivit, které jsou vázány na pohybovou činnost organismu psa, jako je AST a ALT. Charakteristická je však i aktivita a její dynamika u LD a LD-1. Stabilitu aktivit v druhé polovině výcviku, popřípadě návrat aktivit k výchozím hodnotám, lze považovat za adaptační proces na výcvikovou zátěž. Další studium si vyžaduje průběh aktivity LD-1 a ALP ve vztahu k minerálnímu metabolismu kostí a k jeho zatížení v průběhu výcvikové zátěže. Tento požadavek zdůvodňují naše výsledky, podle nichž dynamika aktivity ALP nepřímo koreluje s dynamikou hladiny anorganického fosforu v krevním séru sledovaných psů.

Souhrnně lze konstatovat, že aktivita ověřovaných enzymů a její dynamika v průběhu výcvikové zátěže se uplatňuje markantními změnami, které lze považovat za reakci vnitřního prostředí na výcvikovou zátěž psa a kterých lze využít jako dílčích testů při vědeckém řízení výcviku ve vztahu k fyziologickým a patofyziologickým procesům zatěžování psa. Těchto poznatků je možné využít především ve výcvikových střediscích za úzké spolupráce kynologa, veterinárního lékaře a příslušné veterinární klinické laboratoře.

Literatura

- BEDRAK, E.: Blood serum enzyme activity of dogs exposed to heat stress and muscular exercise. *J. appl. Physiol.*, 20, 1955, s. 587-590.
- CORNELIUS, C. E. — BURNHAM, L. G. — HILL, H. E.: Serum transaminase activities of thoroughbred horses in training. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 142, 1963, s. 639-642.
- JEFFCOTT, L. B.: Haematology in relation to performance and potential. *J. S. Afr. veter. med. Assoc.*, 45, 1974, s. 279-285.
- KONRÁD, J. — CUPÁK, M. — HRUŠOVSKÝ, J. — HUSÁK, S.: Vliv dlouhodobé fyzické a psychické výcvikové zátěže na červený krevní obraz psa. *Veter. Med. (Praha)*, 29, 1984, s. 659-668.
- LOLL, H. — HILSCHER, A.: Änderungen der Substratkonzentration und der Enzymaktivität im Serum durch körperliche Belastung. *Ärzt. Forsch.*, 12, 1958, s. 85-88.
- OTTO, P. — SCHMIDT, E. — SCHMIDT, F. W.: Enzymspiegel im Serum bei körperlicher Arbeit und ambulanten Patienten. *Klin. Wschr.*, 42, 1964, s. 75-81.
- QUY, P. S. — SNOW, D. H.: The effect of training and detraining on lactate dehydrogenase isoenzymes in the horse. *Biochem. biophys. Res. Commun.*, 75, 1977, s. 863-869.
- REITHMÜLLER, H. — WELS, A.: Trainingswirkungen an Vollblütern (Muskelspezifische Enzyme). *Zbl. Veter.-Med.*, 19 A, 1972, s. 537-545.
- SCHLEICHER, H.: Die Fructose-1,6-Diphosphatase in Serum klinisch gesunder Hunde. [Diss.] F. V. Berlin 1966.
- SCHULZE, F. W.: Glutamat-Oxalacetat-Transaminase (GOT), Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GPT) und Sorbitdehydrogenase (SDH) in Serum und im Plasma des Hundes vor und nach körperlicher Belastung. [Diss.] F. V. Berlin 1967.
- SEVELA, M. — TOVÁREK, J.: *Cas. Lék. čes.*, 98, 1959, s. 844.

Došlo dne 29. 4. 1987

КОНРАД, Я. — ЦУПАК, М. — ГРУШОВСКИ, Й. — ГУСАК, С. — ШМИД, К. (Ветеринарный институт, Брно; Военный ветеринарный научно-исследовательский институт усовершенствования врачей, Кошице): **Активность ферментов под влиянием дрессировочной нагрузки служебной собаки.** *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 185-191.

Изучалась динамика активности пяти видов ферментов — аспартаминотрансферазы (AST), аланинаминотрансферазы (ALT), лактатдегидрогеназы (LD), термостабильной фракции лактатдегидрогеназы (LD-1), щелочной фосфатазы (ALP) — у 30 сук разделенных на две возрастные группы, в течение долговременной дрессировки продолжительностью 130 дней. Обе трансаминазы показывают характеристическую динамику активности с начальной депрессией между 30—40 днем дрессировки, с ее постепенным повышением у AST и резки у ALT до конца дрессировки. Статистически значимую динамику наблюдаем у LD с постоянным понижением активности у обеих возрастных групп собак. LD-1 является хакартерной депрессией активности до значимого подъема в конце дрессировки. Активность А Р показывает равномерное колебание, но все время значимо под границей исходных значений. Изучаемые активности ферментов можно использовать в качестве частичных испытаний при научном руководстве дрессировкой по отношению к физиологическим и патофизиологическим процессам собаки под нагрузкой.

клиническая ферментология; физиология дрессировки; ветеринарная кинология

KONRÁD, J. — CUPÁK, M. — HRUŠOVSKÝ, J. — HUSÁK, S. — ŠMÍD, K. (University of Veterinary Medicine, Brno; Military Veterinary Extension and Research Institute, Košice): *Enzymatic Activities of Service Dogs as Influenced by the Training Stress.* *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988 (3) : 185-191.

The activities were studied in five kinds of enzymes (asparate aminotransferase — AST, alanine aminotransferase — ALT, lactate dehydrogenase — LD, the thermally stable fraction of lactate dehydrogenase — LD-1, and alkaline phosphatase — ALP) of 30 male dogs. The dogs, divided into two age categories, were

studied during a long-continued training (130 days). Both transaminases exhibit characteristic changes in the activity, with a depression at the beginning between the 30th and 40th days of training, followed by a slow increase in AST and by a rapid increase in ALT, continuing until the end of the training period. A statistically significant activity pattern was recorded in LD: the activity declined continuously in both age groups of dogs. LD-1 exhibited an activity depression continuing until the 70th day of training, followed by an increase which reached statistical significance towards the end of the training. ALP activity varied regularly, but always remained significantly below the starting values. The enzymatic activities can be used as partial tests during the scientific management of the training of dogs in relation to the physiological and pathophysiological processes in the bodies of the dogs subjected to the training stress.

clinical enzymology; physiology of training; veterinary cynology

KONRÁD, J. — CUPÁK, M. — HRUŠOVSKÝ, J. — HUSÁK, S. — ŠMÍD, K. (Veterinärmedizinische Hochschule, Brno; Militärisches Forschungs- und Schulungsinstitut für Veterinärmedizin, Košice): *Enzymaktivität unter dem Einfluss der Dressurbelastung des Diensthundes*. Veter. Med. (Praha), 33, 1988 (3) : 185-191.

Wir untersuchten die Aktivitätsdynamik von fünf Enzymen — Asparataminotransferase (AST), Alaninaminotransferase (ALT), Laktatdehydrogenase (LD), thermostabile Fraktion der Laktatdehydrogenase (LD-1), alkalische Phosphatase (ALP) — bei 30 Rüden in zwei Alterskategorien während 130 Tage ihrer Dressur. Die beiden Transaminasen weisen eine charakteristische Aktivitätsdynamik mit einer Anfangsdepression zwischen dem 30.—40. Dressurtag mit ihrer allmählichen Steigerung bei der AST und mit einer steilen Steigerung bei der ALT bis zum Dressurende auf. Eine statistisch bedeutende Dynamik können wir bei der LD mit einem andauernden Aktivitätsabfall bei den beiden Alterskategorien beobachten. Die LD-1 ist durch eine Aktivitätsdepression bis zum 70. Dressurtag, dann durch eine erhöhte Aktivität bis zu einer signifikanten Steigerung am Dressurende charakterisiert. Die ALP-Aktivität weist eine regelmässige Schwankung auf, die aber stets signifikant unter der Grenze der Ausgangswerte liegt. Die studierten Enzymaktivitäten können als Teiltests bei wissenschaftlicher Leitung der Dressur in Beziehung zu physiologischen und pathophysiologischen Prozessen des dressierten Hundes genutzt werden.

klinische Enzymologie; Dressurphysiologie; Veterinärkynologie

Adresy autorů:

Prof. MVDr. Jaroslav Konrád, DrSc., MVDr. Miloš Cupák, MVDr. Stanislav Husák, CSc., MVDr. Karel Šmíd, CSc., Vysoká škola veterinární, Palackého 1-3, 612 42 Brno

Prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Vojenský veterinárny doškoľovací a výskumný ústav, Kukučínova 2. 040 00 Košice

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 4 časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

mají být uveřejněny články:

- A. Š v a s t o v á : *Haemophilus somnus* jako původce broncho-pneumonie telat
- J. H a l o u z k a, Z. H u b á l e k, Z. J u ř i c o v á : Srovnání tří sérologických testů pro detekci protilátek proti viru Bhandža u domácích přežvýkavců
- B. P á s t o r o v á, J. A r e n d a r č i k, M. M o l n á r o v á : Vplyv hormonálnej stimulácie Folistimanon (FSH) a pro-trahovanej expozície gama-žiarenia na hladiny katecholamínov v hypotalame, hypofýze a v nadobličkách oviec v anestrickom období
- L. Š e m r á k o v á : Využitie ONPG-testu v rýchlej diagnostike niektorých rodov enterobaktérií
- P. N o s k o v i č, Š. M o z e š, S. K u c h á r, J. K o p p e l : Vplyv inzulínu na obsah RNK a proteínov v laterálnom a ventromediálnom hypotalame
- Z. B o r o š k o v á, M. B e n k o v á, K. Č e c h, J. P e k á r e k : Imunostimulačný účinok nešpecifického transférového faktora na T a B dependentné lymfocyty morčiat v ochrannom efekte pri askaridóze
- F. Š t ě r b a : Experimentální indukce spontánní brucelové infekce morčat kontaktem se subkutánně infikovanými morčaty *Brucella suis*, biovar 2
- M. M u š k a, J. M á c a : Forézie *Bovicola bovis* {Mallophaga} na mouchách čeledi *Muscidae*

CONTENTS

Kmeř V., Koniarová I., Stachová M.: The Occurrence and Properties of <i>Selenomonas ruminantium</i> in Calves in the Period of Milk Nutrition	129
Dušinský R., Simon M., Nouzovská D.: Preparation of Monoclonal Antibodies to the Surface Antigens of Bovine Cells	135
Rubeš J., Raszyk J., Hořínová Z., Gajdůšková V., Mašek J., Dočekalová H., Bartoš J., Neumannová M.: Monitoring the Chromosomal Mutations of Pigs in Large Herds	143
Kaláb P., Hájek J.: Reliability of Pregnancy Diagnosis in Sows Using Direct Radioimmunoassay of Estron-Sulphate	151
Molnářová M., Arendarčík J.: The Effect of Vitamin A on the Trypsin-Inhibition Activities (TIA) of the Blood Plasma and Cervical Mucus of Ewes with Hormonally Treated Ovaries in Oestrus	155
Ruprich J., Piskač A., Malá J.: Using the Radioimmunological Assay of the Ochratoxin A Mycotoxin for the Screening Control of Cereal-Type Foods and Feeds of Plant Origin	165
Kredl F., Svobodník J.: The Residues of Chlorinated Pesticides and Polychlorinated Biphenyls in Pork and Ham Samples in the Last Years and at Present	175
Konrád J., Cupák M., Hrušovský J., Husák S., Šmíd K.: Enzymatic Activities of Service Dogs as Influenced by the Training Stress	185

INHALT

Kmeř V., Koniarová I., Stachová M.: Vorkommen und Eigenschaften von <i>Selenomonas ruminantium</i> bei Kälbern zur Zeit der Milchernaehrung	129
Dušinský R., Simon M., Nouzovská D.: Zubereitung monoklonaler Antikörper gegen Oberflächenantigene von Rinderzellen	135
Rubeš J., Raszyk J., Hořínová Z., Gajdůšková V., Mašek J., Dočekalová H., Bartoš J., Neumannová M.: Monitorieren chromosomaler Mutationen der Schweine in Grosszuchten	143
Kaláb P., Hájek J.: Die Trächtigkeitsdiagnostik bei Sauen mittels Radioimmunoanalyse des Östronsulfats im Blutserum bei Anwendung der direkten Methode ohne Probenextraktion	151
Molnářová M., Arendarčík J.: Einfluss des A-Vitamins auf die Trypsin-inhibitionsaktivität (TIA) des Blutplasmas und des Zervikalschleimes nach hormonaler Beeinflussung der Ovarien der Schafe zur Zeit der Brunst	155
Ruprich J., Piskač A., Malá J.: Anwendung der radioimmunologischen Bestimmung von Mykotoxin Ochratoxin A zur Screening-Kontrolle der Lebens- und Futtermittel pflanzlicher Herkunft vom Getreidetyp	165
Kredl F., Svobodník J.: Residuen chlorierter Pestizide und polychlorierter Biphenyle im Schweinefleisch und in Schinken in früheren Jahren und heute	175
Konrád J., Cupák M., Hrušovský J., Husák S., Šmíd K.: Enzymaktivität unter dem Einfluss der Dressurbelastung des Diensthundes	185



Rukopisy odevzdány k tisku 1. 12. 1987 — Podepsáno k tisku 1. 2. 1988

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA • Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází měsíčně • Redaktorka ing. Jovanka Václavíčková • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 257541 • Vytiskl MÍR, Novinářské závody, n. p., závod 6, tř. Lidových milicí 22, 120 00 Praha 2 • © Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1988

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS-ÚED Praha, závod 01 — AOT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS-ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 656 07 Brno; PNS-ÚED Praha, závod 03, Kubánská 1539, 708 72 Ostrava-Poruba. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS — ústřední expedice a dovoz tisku Praha, závod 01, administrace vývozu tisku, Kafkova 19, 160 00 Praha 6.