

VĚDECKÝ ČASOPIS



VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

10

ROČNÍK 36 (LXIV)
PRAHA
ŘÍJEN 1991
CS ISSN 0375-8427

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÁ
ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
PRO ZEMĚDĚLSTVÍ

Řídí redakční rada: doc. MVDr. Karel Hruška, CSc. (předseda), prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., prof. MVDr. Bohumír Hofírek, DrSc., doc. MVDr. Gabriel Kováč, DrSc., doc. MVDr. Imrich Maraček, CSc., MVDr. Zdeněk Pospíšil, CSc., doc. MVDr. Ivan Rosíval, CSc., prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc.

Vedoucí redaktorka ing. Zdeňka Radošová

OBSAH

Nitray J., Sirotkin A. V., Politov V. P., Marinčenko G. V.: Sekrečná aktivita buniek granulózy vaječníkov kráv ve vzťahu k produkcii prolaktínu alebo prolaktínu podobnej substance <i>in vitro</i>	577
Liehman P.: Porovnaní různých kryokonzervačních médií pro vitifikaci sedmidenních embryí skotu	585
Rybníkář A., Vrzal V., Chumela J.: Minimální efektivní dávky vakcíny proti trichofytóze skotu	593
Ježková D., Smrčková M.: Změny koncentrace lipidů v krevní plazmě u březích prasnic	599
Krajničáková M., Elečko J., Bekeová E., Maraček I., Hendrichovský V.: Biometrické parametre maternice a vaječníkov po aplikácii Depotocinu inj. Spofa v ranom puerpériu oviec	607
Švický E., Škarda R., Marcaník J., Hrušovský J.: Patologicko-morfologické a histoenzymologické nálezy po intoxikácii VX látkou (organofosfát) u oviec	619
Holovská K., Lenártová V., Koppel J., Havassy I., Javorský P., Rybošová E.: Aktivita glutamátdehydrogenázy a glutamínsyntetázy v tráviacom aparáte jahniat vo vzťahu k veku	625
Ništiar F., Mižik P., Rexa R., Mojžiš J., Hrušovský J., Ivanko Š., Ništiarová A.: Vplyv gama-žiarenia na <i>Tetrahymena pyriformis</i> kmeň W	633

CONTENTS

Nitray J., Sirotkin A. V., Politov V. P., Marinčenko G. V.: The secretion activity of granulosa cells in the cows' ovaries in relation to in-vitro production of prolactin or prolactin-like substance	583
Liehman P.: Comparison of different cryopreservation media for vitrification of seven-day bovine embryos	592
Rybníkář A., Vrzal V., Chumela J.: Minimum effective doses of vaccine against bovine trichophytosis	597
Ježková D., Smrčková M.: Variations of lipid concentrations in the blood plasma of pregnant sows	606
Krajničáková M., Elečko J., Bekeová E., Maraček I., Hendrichovský V.: Biometric parameters of uterus and ovaries after administration of Depotocin inj. Spofa in early puerperry of sheep	616
Švický E., Škarda R., Marcaník J., Hrušovský J.: Patho-morphological and histo-enzymological findings after VX chemical (organophosphate) intoxication in sheep	622
Holovská K., Lenártová V., Koppel J., Havassy I., Javorský P., Rybošová E.: The activity of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in the digestive tract of lambs in relation to their age	632
Ništiar F., Mižik P., Rexa R., Mojžiš J., Hrušovský J., Ivanko Š., Ništiarová A.: The effects of gamma-radiation on the W strain of <i>Tetrahymena pyriformis</i>	636

SEKREČNÁ AKTIVITA BUNIEK GRANULÓZY VAJEČNÍKOV KRÁV VO VZŤAHU K PRODUKCIÍ PROLAKTÍNU ALEBO PROLAKTÍNU PODOBNEJ SUBSTANCIE *IN VITRO*

J. Nitray, A. V. Sirotkin, V. P. Politov, G. V. Marínčenko

NITRAY, J. — SIROTKIN, A. V. — POLITOV, V. P. — MARINČENKO, G. V. (Výskumný ústav živočíšnej výroby, Nitra; Výskumný ústav genetiky a reprodukcie, Leningrad): *Sekrečná aktivita buniek granulózy vaječníkov kráv vo vzťahu k produkcii prolaktínu alebo prolaktínu podobnej substance in vitro*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 577—583.

V práci sme zistili, že päťdňová kultivácia boviných buniek granulózy bez séra a s prídavkami séra v kultivačnom médiu spôsobila, v závislosti od času kumulovania imunoreaktivity prolaktínu (PRL), ktorá sa prejavila v jeho kvantitatívnom náraste v kultiváte. Folikulostimulačný hormón (FSH), pridaný v dávkach 10 až 10 000 ng.ml⁻¹ média, výrazne zvýšil imunoreaktivitu PRL v preukaznej závislosti od použitej dávky. Naopak luteinizačný hormón (LH) stimuloval produkciu PRL-podobnej látky iba pri maximálnej dávke 10 IU.ml⁻¹. Jeho nízke dávky (0,01—1 IU.ml⁻¹) nemali na tento proces preukazný vplyv. Nízke dávky oxytocínu (1,10 mIU.ml⁻¹) blokovali a vysoké (100 alebo 1000 mIU.ml⁻¹) stimulovali produkciu PRL podobnej substance bunkami granulózy. Arginín-vazopresín — AVP (v dávkach 1—1000 ng.ml⁻¹), arginín-8-vazotocín-AVT (10—10 000 ng.ml⁻¹) a LH-RH (10—10 000 ng.ml⁻¹) neovplyvňovali imunoreaktivitu PRL a jeho nasledovné kumulovanie v bunkách granulózy boviných vaječníkov. Uvedené údaje naznačujú možnosť produkcie PRL alebo PRL-podobnej substance bovinými ovariálnymi bunkami *in vitro* a zároveň vplyv gonadotropínov na mechanizmus regulácie tohto procesu.

kravy; vaječníky; bunky granulózy; prolaktín; FSH; LH; oxytocín

Ovariálne funkcie sú regulované radom rôznych substancií hypotalamického, hypofyzárneho a intraovariálneho pôvodu (Guraya, 1985; Golubev a i., 1987; Tsafiriri, 1988). Nezanedbatelnú úlohu v kontrole regulácie zohráva prolaktín (Fink, 1986; Tsafiriri, 1988; Dusz a Tilton, 1990). V poslednom období sa objavili údaje, označujúce také hormóny, ako LH-RH-podobná substancia (Atena i., 1986, 1987), oxytocín a vazopresín (Schams, 1987; Wathes, 1988) za hormóny v určitom množstve syntetizované vo vaječníkoch. Existujú i niektoré nepriame dôkazy o intraovariálnej produkcii PRL:

- skutočnosť, že PRL je tvorený nielen v hypofýze, ale aj v iných tkanivách, napr. v maternici opíc (Ying a i., 1988), alebo v prísemenníku myši (Brumlov a Adams, 1990);
- vysoká hladina PRL vo folikulárnej tekutine ľudí, kráv a prasníc (Guraya, 1985; Przala a i., 1985);

— existencia mRNA pre PRL v bunkách granulózy a žltého telieska vaječníkov prasníc (Einspanier a i., 1986).

Cieľom našich experimentov bolo skúmať možnosť produkcie PRL bunkami granulózy kráv *in vitro* a určiť niektoré endokrinné mechanizmy regulácie tohto procesu.

MATERIÁL A METÓDY

PRÍPRAVA A INKUBÁCIA GRANULÓZNYCH BUNIEK

Vaječníky neskorej luteálnej, skorej a strednej folikulárnej fázy estrálneho cyklu sme získali od kráv vo veku 2–4 rokov bez reprodukčných porúch. Hodinu po ich zabííi sme obsah 2–5 mm folikulov asepticky aspirovali a bunky granulózy separovali centrifugáciou pri $200 \times g$ po dobu 5 minút. Po odliatí supernatantu sme bunky granulózy resuspendovali Pasteurovou pipetou do sterilného média TCM 199 (Sigma, St. Louis, USA) s 5 % prídavkom bovinného fetálneho séra (VÚVeL, Brno). Celý proces — centrifugácia, prenesenie do média a pipetovanie — bol opakovaný trikrát. Po poslednej centrifugácii sme granulózu resuspendovali do inkubačného média TCM 199 obohateného o 10 % mIU.ml⁻¹ inzulínu (Léčiva, Praha), 6 mg.ml⁻¹ pufru Hepes (Sigma, St. Louis, USA), 200 mg.ml⁻¹ pyruvátu Na (Serva, Heidelberg, SRN), 600 mg.ml⁻¹ laktátu Ca (Serva, Heidelberg, SRN) a 50 mg.ml⁻¹ gentamicínu (Pharmácia, Sofia, Bulharsko). V niektorých experimentálnych skupinách sme uvedené inkubačné médium doplnili o 5 % fetálneho bovinného séra, LH (Kirchsteinov Ústav mikrobiologie, Riga, ZSSR — 0,01 až 10 IU.ml⁻¹), FSH (Calbiochem-Behring Inc., La Jolla, USA — 0,01 až 10 mg.ml⁻¹), LH-RH (Hoechst, AG, Frankfurt n. M., SRN — 10 až 10 000 ng.ml⁻¹), arginin-8-vazopresín (Ústav organickej biochémie, Praha — 1 až 1000 ng.ml⁻¹), oxytocín (Gedeon Richter, Budapešť, Maďarsko — 1 až 1000 mIU.ml⁻¹), arginin-8-vazotocín (Chemický ústav Univerzity Leningrad, ZSSR — 10 až 10 000 ng.ml⁻¹).

2 ml bunečnej substance v koncentrácii 1 milión buniek v ml sme preniesli do kultivačných platničiek (Sterilin LTd. Feltham, Anglicko) a inkubovali pri teplote 37 °C s prídavkom 5 % CO₂. V experimente číslo 1 sme médium aspirovali v každom dni 5dňovej inkubácie. V experimentoch 2 a 3 sme po dvoch dňoch kultivácie (adaptácie) médium vymenili. Všetky vzorky boli po dvoch dňoch umiestnené v čerstvom médiu.

RADIOIMUNOANALÝZA PRL

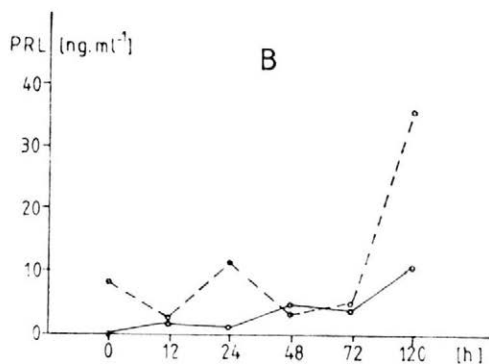
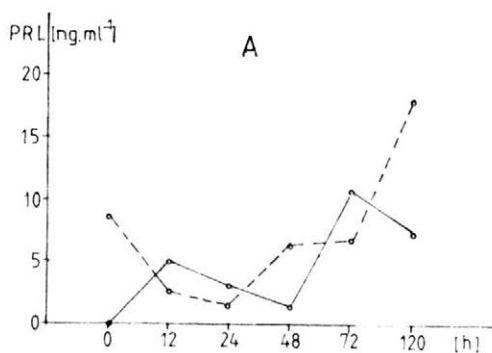
Koncentráciu PRL sme determinovali v duplikátoch kultivovanej vzorky metódou RIA stanovenia v pevnej fáze (Tarasenko a i., 1975). Bovinný PRL (NIH-P-S18) pre imunizáciu králikov a štandard nám laskavo poskytol Dr. S. Raiti (National Hormone and Pituitary Program, University of Maryland, Baltimor, USA). Králičia protilátka k PRL mala krížovú reakciu s boviným inzulínom, rastovým hormónom, LH, FSH, myším PRL a rastovým hormónom menšiu než 0,001 %. Citlivosť rádioimunoanalýzy bola 9 pg na vzorku a presnosť 95,3 %. Koeficient v rámci a medzi meraniami neprekročil 6 %.

ŠTATISTICKÉ SPRACOVANIE VÝSLEDKOV

Každú experimentálnu skupinu predstavovali vzorky v 4–5násobnom opakovaní. Stupeň produkcie prolaktínu sme určili na základe jeho koncentrácie v prepočte na 10⁶ buniek na deň. Preukazné rozdiely medzi skupinami sme testovali Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Pri analýze prvého experimentu sme zistili, že počas *in vitro* kultivácie buniek granulózy v médiu bez séra i s prídavkom séra sa imunoreaktivita PRL — podobnej substance zvyšovala v závislosti od jej časového priebehu (obr. 1). Prídavky FSH (1 g.ml⁻¹), alebo LH (0,1 IU.ml⁻¹) do média bez obsahu séra nespôsobili priame a okamžité zvýšenie hladiny

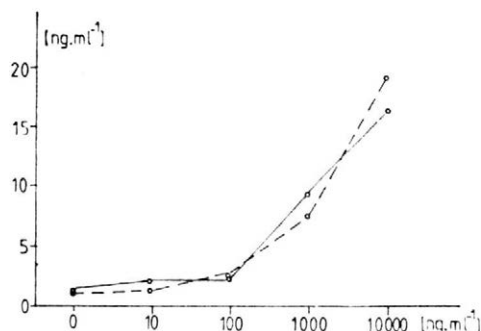


1. Akumulácia imunoreaktivity PRL [ng.ml⁻¹] v granulóznych bunkách vaječníkov kráv *in vitro* v závislosti od inkubačnej doby [h]; — médium bez séra; - - - - médium so sérom; A — prídavok FSH [1 g.ml⁻¹]; B — prídavok LH [0,1 IU.ml⁻¹] — *In-vitro* accumulation of PRL immunoreactivity [ng/ml] in granulosa cells of the cows' ovaries in dependence on incubation time [h]; — serum-free medium; - - - - serum-dependent medium; A — FSH additions [1 g/ml]; B — LH additions [0.1 IU/ml]

PRL v kultiváte. Po 12—120 hodinách sa však objavilo zvýšenie jeho imunoreaktivity, čo sa prejavilo rastom koncentrácie na 7—12 ng.ml⁻¹. V čase ukončenia kultivácie sme zistili preukazne vyššie hladiny PRL v kultiváte s FSH.

V médiu so sérom sme na začiatku kultivácie zistili určité množstvo PRL (pravdepodobne súvisiace s prítomnosťou séra). Po 12—24hodinovej kultivácii sa jeho hladina redukovala, no neskôr opätovne zvyšovala a po 120hodinovej kultivácii 2,1—4,1krát prevyšovala množstvo PRL pri začatí experimentu. V médiu so sérom, ako i v médiu bez obsahu séra, sme zistili vyššiu hladinu PRL-podobnej látky v prítomnosti FSH než po aplikácii LH. Toto zistenie nás viedlo k štúdiu vplyvu gonadotropínov na syntézu PRL bunkami granulózy. Výsledky experimentu číslo 2 (obr. 2) ukázali stimulačný vplyv FSH na produkciu PRL-podobnej substancie v závislosti od použitej dávky. Po dvojdnovej kultivácii buniek granulózy v médiu so sérom a bez séra a zároveň bez prídavku FSH sme zistili minimálnu koncentráciu PRL. Prídavky malého množstva FSH (10 alebo 100 ng.ml⁻¹) do oboch médií spôsobili iba malé zvýšenie PRL-podobnej substancie, veľké dávky (1000 alebo 10 000 ng.ml⁻¹) naopak aktivovali tento proces 14—18krát.

Experiment 3 (tab. I) sme zamerali k určeniu vplyvu LH, LH-RH a niektorých nonapeptidových hormónov na produkciu PRL-podobnej substancie bunkami granulózy po dvojdnovej kultivácii v médiu, obohatom o fetálne bovinné sérum. Zistili sme, že nízke a stredné dávky LH (10 IU.ml⁻¹) preukazne aktivovali tento proces (2,3krát). LH-RH (10—10 000 ng.ml⁻¹) tento efekt nevykazoval, pričom sme nezistili ani vplyv veľkostí dávky na syntézu PRL-podobnej substancie. V médiu s prídavkom 1 alebo 10 mIU.ml⁻¹ oxytocínu sme po dvojdnovej kultivácii nezistili detekovateľné množstvo PRL. Veľké dávky oxytocínu (100 a 1000 mIU.ml⁻¹) však kumulovanie PRL-podobnej substancie signifikantne



2. Vplyv rôznych dávok folikuly stimulujúceho hormónu (FSH) na produkciu PRL (alebo PRL-podobnej substancie) bunkami granulózy vaječníkov kráv *in vitro*; — médium bez séra; - - - - médium so sérom — The effects of different FSH doses on *in-vitro* PRL (or PRL-like) production in granulosa cells of the cows' ovaries; — serum-free medium; - - - - serum-dependent medium

I. Vplyv niektorých nonapeptidových hormónov na produkciu PRL (PRL-podobnej substancie) bunkami granulózy *in vitro*; * — koncentrácie preparátov signifikantne odlišné od kontrolnej skupiny ($P < 0,05$) — The effect of some nonapeptide hormones on *in vitro* PRL (PRL-like) production in granulosa cells; * — preparation concentrations significantly different from the control group ($P < 0,05$)

Preparát ¹	Prolaktín ² [ng . ml ⁻¹]
LH [IU . ml ⁻¹] 0,01	3,05 ± 0,94
0,10	1,53 ± 0,62
1,00	0,87 ± 0,38
10,00	2,98 ± 0,19*
LH-RH [ng . ml ⁻¹] 10	1,22 ± 0,48
100	0,59 ± 0,23
1 000	1,35 ± 0,22
10 000	0,59 ± 0,32
Oxytocín [mIU . ml ⁻¹] 1	0*
10	0*
100	4,56 ± 1,00*
1 000	2,76 ± 0,58*
AVP [ng . ml ⁻¹] 1	1,23 ± 0,21
10	0,44 ± 0,20*
100	1,79 ± 0,31
1 000	1,40 ± 0,10
AVT [ng . ml ⁻¹] 10	1,05 ± 0,25
100	0,53 ± 0,25
1 000	1,05 ± 0,25
10 000	1,18 ± 0,57
Kontrolná skupina ³	1,28 ± 0,37

¹preparation, ²prolactin, ³control group

zvyšovali. Arginin-8-vazopresín v nízkych dávkach 10 ng . ml⁻¹ mierne zvýšil koncentráciu PRL. Vyššie dávky tohto nonapeptidu 1, 100 alebo 1000 ng . ml⁻¹ neboli efektívne. Všetky koncentrácie arginín-8-vazotocínu (v dávkach 10 až 10 000 ng . ml⁻¹) sa pri analýze vplyvu na produkciu PRL-podobnej substancie ukázali neefektívnymi.

Možnosti intragonadálnej syntézy PRL sú demonštrované vysokými hladinami PRL, alebo PRL-podobnej substancie v prísemenníku (Brumlov a Adams, 1990), folikulárnej tekutine žien, kráv a prasníc (Guraya, 1985; Przala a i., 1985) a nakoniec prítomnosťou mRNA pre syntézu PRL v ovariálnych bunkách prasníc (Einpanier a i., 1986).

Výsledky našich experimentov sú prvým dôkazom o produkcii PRL, alebo PRL-podobnej substancie bunkami vaječníkov. Svedčí o tom predovšetkým zvýšená imunoreaktivita PRL, zistená v médiu s kultúrou buniek granulózy vaječníkov kráv (obr. 1). V prítomnosti fetálneho bovinného séra sa produkcia PRL zdá byť intenzívnejšia.

V oboch typoch použitého kultivačného média (bez a s prídavkom séra) sme určili vyšší stupeň imunoreaktivity PRL-podobnej substancie po prídavku FSH, ako i po pridaní ďalšieho gonadotropného hormónu LH. Toto zistenie svedčí o vplyve gonadotropínov na produkciu PRL-podobnej substancie.

Výsledky experimentu číslo 2 (obr. 2) charakterizuje rapídny nárast PRL-podobnej substancie po aplikovaní FSH do oboch typov kultivačného média, ktorý závisí od veľkosti použitej dávky. Vplyv LH (tab. I) je podobný i keď štatisticky preukazný stimulačný efekt je iba pri použití vysokej dávky ($10 \text{ IU} \cdot \text{ml}^{-1}$). Zvýšenie imunoreaktivity PRL-podobnej substancie po prídavkoch gonadotropínov nie je spôsobené prípadnou kontamináciou média, pretože médium bez séra po aplikácii FSH a LH pred kultiváciou neobsahovalo detekovatelné množstvo PRL (obr. 1). Uvedená skutočnosť potvrdzuje, že FSH a pravdepodobne i LH zohrávajú istú úlohu v stimulácii sekrécie PRL alebo PRL-podobnej substancie vaječníkmi.

Je známe, že okrem gonadotropínov existuje i niekoľko regulátorov funkcií vaječníkov, ktorých miestom vzniku sú samotné vaječníky. Možeme uviesť LH-RH- podobnú substanciu (Aten a i., 1986, 1987), oxytocín a vazopresín (Wathes, 1989), ktoré sú nielen produkované vo vaječníkoch, ale zároveň sú dôležitými regulátormi produkcie steroidných hormónov a dozrievania oocytov (Knecht a i., 1985; Sirotkin a i., 1987, 1990). Výsledky nášho experimentu uvedenú skutočnosť vo vzťahu k produkcii PRL-podobnej substancie potvrdzujú.

Zistili sme, že oxytocín sa v nízkych dávkach ($1\text{--}10 \text{ mIU} \cdot \text{ml}^{-1}$) podieľa na blokovaní a vo veľkých dávkach ($100\text{--}1000 \text{ mIU} \cdot \text{ml}^{-1}$) na stimulácii produkcie PRL-podobnej substancie. Toto zistenie môže potvrdzovať účasť oxytocínu v regulácii syntézy PRL-podobnej substancie vo vaječníkoch. Podobnú úlohu však nemožno podľa našich zistení prisudzovať vazopresínu, vazotocínu ani LH-RH. Keďže LH-RH (Knecht a i., 1985; Tsafiriri, 1988) a vazotocín (Sirotkin a i., 1987, 1990) môžu byť potenciálnymi regulátormi steroidogenézy v bovinných vaječníkoch, môžeme vysloviť predpoklad relatívnej nezávislosti procesov produkcie steroidných hormónov a sekrécie PRL-podobnej substancie vaječníkmi.

Úloha intraovariálneho PRL, jeho vzťah k ostatným intraovariálnym regulátorom a celý rad iných súvislostí je predmetom intenzívneho výskumu, ale je známe, že aplikácia PRL môže inhibovať sekréciu gonadotropínov (Fink, 1988), ovariálnych hormónov, dozrievanie oocytov

(Tsafriri, 1988; Dusza a Tilton, 1990) a stimulovať luteinizáciu ovariálnych buniek (Murphy a Rajkumar, 1985; Dusza a Tilton, 1990). Nie je možné vylúčiť, že gonadotropíny môžu kontrolovať funkcie vaječníkov prostredníctvom regulácie sekrécie PRL. V tomto procese môže byť zahrnutý i ovariálny oxytocín, ktorého sekrécia je tiež pod kontrolou gonadotropínov (Schams, 1987). Takto napríklad môžu gonadotropíny regulovať vývoj žltého telieska dvomi cestami — oxytocínom a prolaktínom. Dvojitý efekt oxytocínu na produkciu PRL-podobnej substancie bunkami granulózy, potvrdený našimi experimentami môže pravdepodobne súvisieť s funkciami ovariálnej spätnej väzby, ktorá reguluje sekréciu týchto dvoch ovariálnych hormónov.

Poznatok o produkcii PRL-podobnej substancie bunkami granulózy vaječníkov kráv *in vitro*, ktorý naša práca prináša je prvou zmienkou o existencii substancie podobného charakteru. Potvrdenie základných aspektov sekrécie a fyziologické účinky „ovariálneho PRL“ v podmienkach *in vitro* a *in vivo* by malo vyplynúť z ďalších experimentálnych prác.

Poďakovanie

Autori práce ďakujú Dr. S. Raitimu (National Hormones and Pituitary Program, University of Maryland, Baltimor, USA) za láskavé poskytnutie preparátov k stanoveniu PRL, Dr. J. Michajlovskému (Ústav experimentálnej endokrinológie, SAV, Bratislava) a Dr. Michajlovi (Chemický ústav Univerzity Leningrad, ZSSR) za poskytnutie syntetických nonapeptidových hormónov. Zároveň autori ďakujú pani A. Lieskovej a pani V. Hrnkovej za technickú pomoc pri realizácii experimentov.

Literatúra

- ATEN, R. F. — WILIAMS, T. — BEHRMAN, H. R.: Ovarian gonadotropin-releasing hormone-like proteins: demonstration and characterization. *Endocrinology*, 118, 1986, s. 961—967.
- ATEN, R. F. — POLAN, M. J. — BAYLESS, R. — BEHRMAN, H. R.: A gonadotropin-releasing hormone (GH-RH) similarity to the GH-RH-like ovarian protein of the rat. *J. clin. Endocrinol. Metab.*, 64, 1987, s. 1288—1293.
- BRUMLOV, W. B. — ADAMS, C. S.: Immunocytochemical detection of prolactin-like immunoreactivity in epididymus of mature male mouse. *Histochemistry*, 93, 1990, s. 299—304.
- DUSZA, L. — TILTON, J. E.: Role of prolactin in the regulation of ovarian function in pigs. *J. reprod. Fert.*, 40, 1990, s. 33—45.
- EINSPANIER, R. — PITZEL, L. — WUTTKE, W. — HAGENDORFF, G. — PREUS, K. D. — KORDALINOU, E. — SCHEIT, K. H.: Demonstration of mRNA for oxytocin and prolactin in porcine granulosa cells and luteal cells. *FEBS Lett.*, 204, 1986, s. 37—44.
- FINK, G.: Gonadotropin secretion and its control. In: KNOBIL, E. — NEILL, V.: *Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press 1986, s. 1349—1377.
- GOLUBEV, A. K. — SIROTKIN, A. V. — KUZMINA, T. J. — MAKAREVOVA, Z. N.: The regulation of farm animals oocytes maturation. *Summ. Sci. Techn. Ser. Anim. Veter. Sci.*, 15, Moskva, 1987, s. 22—50.
- GURAYA, S. S.: *Biology of ovarian follicles in mammals*. Berlin-Heidelberg, Springer Verlag 1985, 320 s.
- KNECHT, M. — RANTA, T. — FENG, P. — SHINOHARA, O. — CATT, K. J.: Gonadotropin-releasing hormone as a modulator of ovarian function. *J. steroid Biochem.*, 23, 1985, s. 771—778.
- MURPHY, B. D. — RAJKUMAR, K.: Prolactin as a luteotropin. *Can. clin. Physiol. Pharmacol.*, 63, 1985, s. 257—264.
- PRZALA, J. — GRAZUL, A. — WIESAK, T. — MUSZYNSKA, A. — DUSZA, J.: Steroid hormone and prolactin in porcine follicular fluid in estrous cycle and early pregnancy. *Exp. clin. Endocrin.*, 86, 1985, s. 291—296.
- ROSS, G. T.: Hormones in antral fluid and the regulation of ovarian function, hormonal control of hypothalamus-pituitarygonadal axis. *Intern. Fr. Biochem. Endocrin.*, New

York—London, 1984, s. 309—324.

SCHAMS, D.: Luteal peptides and intracellular communications. *J. Reprod. Fertil.*, 34, 1987, s. 87—99.

SIROTKIN, V. V. — POLENOV, A. L. — GARLOV, P. E.: Involvement of nonapeptide hormones in animal reproductive functions. *Summ. Sci. and Techn. Ser. Anim. and Veter. Sci.*, 15, 1987, s. 3—21.

SIROTKIN, A. V. — GERASIMOVA, G. G. — GOLUBEV, A. K. — DMITRIJEV, V. B.: The effect of arginine-vasotocin on the production of steroid hormones by mouse, cow and chicken ovarian tissues *in vitro*. *Biomed. Sci.*, 1, 1990, s. 308—310.

TARANENKO, A. G. — KASIMOV, Z. N. — FEDOSIMOV, V. A.: Investigation of prolactin level in bovine blood. *Fiz. Zb.*, 61, 1975, s. 648—654.

TSAFRIRI, A.: Local nonsteroidal regulators of ovarian function. In: WEILL, J. — KNOBIL, E.: *Physiology of Reproduction*. New York, Raven Press 1988, s. 527—565.

WATHES, D. C.: Oxytocin and vasopressin in the gonads. *Oxf. Rev. Reprod. Biol.*, 11, 1988, s. 226—283.

YING, J. K. — MAIER, D. B. — RANDOLPH, J. F. — KUSLIS, S. — RIDDICK, D. H.: Stimulation of uterine prolactin secretion by human chorionic gonadotropin and progesterone in the cynomolgus monkey. *Fertil. Steril.*, 50, 1988, s. 976—979.

Došlo dňa 13. 9. 1990

NITRAY, J. — SIROTKIN, A. V. — POLITOV, V. P. — MARINČENKO, G. V. (Research Institute of Animal Production, Nitra; Research Institute of Genetics and Reproduction, Leningrad): *The secretion activity of granulosa cells in the cows' ovaries in relation to in-vitro production of prolactin or prolactin-like substance*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (10): 577—583.

Ovarian functions are regulated by a wide variety of substances of hypothalamic, pituitary and intraovarian origin. In particular, prolactin (PRL) plays an important role in the control of ovaries. The aim of our in-vitro experiments was to prove a possibility of PRL production by bovine granulosa cells and to search into the endocrine regulators of this process. In the course of experiment 1 (Fig. 1) it was observed that the marked time-dependent accumulation of immunoreactive PRL took place during long-time cultivation of granulosa cells both in serum-free and in serum-dependent medium. After 12—24 hours of cultivation this level was reduced, but after 120 hours of cell culture the medium PRL-immunoreactivity gradually rose to exceed the starting level 2.1—2.4 times. FSH additions (10—10 000 ng/ml) led to a dramatical rise of PRL-immunoreactivity in a dose-dependent manner (Fig. 2). A greater increase in FSH doses (1000 or 10 000 ng/ml) activated this process 14.0—18.0 times. In the other experiments (Tab. I) the effects of LH, LH-RH and various nonapeptide hormones on the PRL-like substance production were investigated. LH stimulated PRL-like substance production at a great dose only (10 IU/ml). The lower doses did not have any significant influence on the process. Low doses of oxytocin (1 or 10 IU/ml) blocked, and higher doses (100—1000 IU/ml) stimulated the granulosa PRL-like production. Arginine-8-vasopressin (AVP) (1—1000 ng/ml), arginine-8-vasotocin (AVT) (10—10 000 ng/ml), or LH-RH (10—10 000 ng/ml) failed to influence the immunoreactive PRL accumulation in the culture medium. The increase of PRL immunoreactivity after gonadotrophin additions was not due to the contamination of preparations by PRL because the serum-free medium did not contain any PRL after FSH and LH additions (but before granulosa cultivation). Thus FSH and probably LH may play a certain role in the stimulation of ovarian PRL-like secretion. Present results are the first information about ovarian production of PRL or PRL-like substance and about the involvement of LH and vasopressin in the regulation of this process. Further in-vitro and in-vivo investigations will be needed to discover the physiological role and the regulation of "ovarian PRL" secretion.

cows; ovaries; granulosa cells; prolactin; FSH; LH; oxytocin

Adresy autorov:

Ing. Jozef Nitray, CSC., dr. A. V. Sirotkin, Výskumný ústav živočíšnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra

Dr. V. P. Politov, dr. G. V. Marinčenko, Výskumný ústav genetiky a reprodukcie, Leningrad-Puškin, SSSR

Upozorňujeme čtenáře, že v čísle 11/91 vědeckého časopisu
VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
mají být uveřejněny tyto příspěvky:

- J. Bíreš, M. Harvan, P. Hudák, L. Mucha, Z. Juhásová: Vplyv prípravku Zindep inj. na zinkémiu, T-lymfocyty a beta-lyzín u gravidných dojníc
- L. Lazár, J. Hajurka: Estradiol, progesterón a cyklické nukleotidy v tekutine folikulov perzistujúcich a z luteálnej fázy pohlavného cyklu kráv
- E. Bekeová, J. Elečko, M. Krajničáková, V. Hendrichovský, I. Maraček: Dynamika zmien koncentrácie cholesterolu, tyroidných hormónov krvného séra v postpartálnom období bahníc
- B. Koudela, M. Vodstrčilová, B. Klimeš, P. Vladík, J. Vítovec: Použití antikokcidia tortrazuril (Baycox, Bayer) při kokcidióze sajících selat
- J. Ruprich, J. Košutzký, V. Ostrý, E. Košutzká: Dlouhodobý příjem mykotoxinu ochratoxin A u kuřat z hlediska reziduí v potravinářských a krmných surovinách
- J. Hrdlička: Identifikace reziduí antibiotik ve tkáních jatečných zvířat elektorforézou s bioautografickou detekcí

POROVNÁNÍ RŮZNÝCH KRYOKONZERVAČNÍCH MÉDIÍ PRO VITRIFIKACI SEDMIDENNÍCH EMBRYÍ SKOTU

P. Liehman

LIEHMAN, P. (Fyziologický ústav ČSAV, Praha): *Porovnání různých kryokonzervačních médií pro vitrifikaci sedmidenních embryí skotu*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 585—592.

Vitrifikační médium, osvědčené pro kryokonzervaci myších osmiblastomerních embryí ($6,85 \text{ mol.l}^{-1}$ glycerolu jako kryoprotektivum), bylo zkoušeno pro konzervaci sedmidenních morul a blastocyst skotu. Vzhledem k tomu, že toto médium nevyhovovalo ani po technické stránce, ani dosaženým přežíváním embryí, bylo jeho složení modifikováno. Obsah glycerolu v něm byl doplněn či částečně nahrazen jinými kryoprotektivy (metanol, sacharóza, L-prolin). Ze srovnání technických parametrů a životaschopnosti embryí po rozmrazení vyplývá, že naše požadavky (technicky nenáročný postup zmrazování a rozmrazování a uspokojivé přežívání) nejlépe splňuje kombinace kryoprotektiv $4,11 \text{ mol.l}^{-1}$ glycerolu a $1,0 \text{ mol.l}^{-1}$ sacharózy. Po vitrifikaci v médiu tohoto složení a po rozmrazení se v podmínkách *in vitro* vyvíjelo 56,0 % embryí.

embrya skotu; vitrifikace; vitrifikační média

V současné době přenos embryí skotu zaznamenává v celém světě stále širší uplatnění. Kromě plemenářských programů našel své místo i ve zjednodušení exportu plemenného materiálu do vzdálených lokalit a v ozdravovacích programech leukózy skotu a dalších nákaz. Se stoupajícím počtem uskutečněných přenosů stoupají i nároky na organizaci jednotlivých akcí a v důsledku toho se stále naléhavěji ozývá požadavek na rychlou, spolehlivou, levnou a technicky nenáročnou kryokonzervační metodu, jež by umožnila dlouhodobé uchovávání bovinních embryí.

Klasické postupy zmrazování embryí skotu, které se objevily na přelomu 70. a 80. let (Willadsen aj., 1978; Lehn-Jensen a Greve, 1981, 1982; Elsdén aj., 1982) sice ve své době znamenaly významný krok kupředu, zdaleka však nesplňují všechny požadavky. Na závalu je především vysoká pořizovací cena programovatelného zařízení, časová náročnost celého zmrazovacího procesu, neuspokojivá spolehlivost. I když některé modifikace klasického postupu přinesly dílčí zlepšení (Bouyssou a Chupin, 1982a, b; Leibo aj., 1982; Niemann aj., 1982; Renard aj., 1982), uspokojivé řešení po všech stránkách se dosud nepodařilo nalézt.

V poměrně nedávné době se objevily snahy o eliminaci potřeby kontrolovaného poklesu teploty, tzn. o kryokonzervaci přímým ponořením do kapalného dusíku [Takeda aj., 1984; Liehman, 1984; Rall a Fahy, 1985]. Předpokladem takového postupu je dostatečná dehydratace buněk embrya, které je možno dosáhnout jen zvýšením koncentrace kryoprotektiv v konzervačním médiu. V závislosti na ní můžeme přímé techniky rozdělit do dvou skupin. První z nich využívá média, která způsobí dostatečnou dehydrataci buněk embrya, po ponoření do kapalného dusíku však normálně krystalizují (např. kombinace 3–4 mol.l⁻¹ glycerolu s 0,25–0,5 mol.l⁻¹ sacharózy — Biery aj., 1985; Krag aj., 1985a, b; Williams a Johnson, 1985; Széll a Shelton, 1986a, b, 1987). Další zvýšení koncentrace kryoprotektiv v médiu vede k dosažení hranice, nad kterou tato média po ponoření do kapalného dusíku ztuhnou amorfně, bez vzniku krystalů ledu. Tento proces se nazývá vitrifikace [Fahy aj., 1984].

Pokusme se nyní stručně shrnout postup přípravy embryí k přímému zchlazení na teplotu kapalného dusíku ve srovnání s klasickými metodami a charakterizovat význam jednotlivých kroků pro konečný úspěch vitrifikace.

Nejdříve je nutno zajistit penetraci dostatečného množství kryoprotektiva do buněk embrya, určeného pro zmrazování. Tento krok je stejný pro klasické metodiky stejně jako pro vitrifikaci a je zajišťován pobytem embryí v médiu s přídavkem kryoprotektiva při pokojové teplotě.

U vitrifikace odpadá postupné či přímé zchlazení na teplotu těsně pod bodem tuhnutí zmrazovacího média (obvykle -7 °C) a navození krystalizace (tzv. seeding), které jsou nezbytnou součástí klasických metod. Po nich následuje pomalé snižování teploty na -30 až -35 °C, během něhož vymrzá postupně voda ze zmrazovacího média a zvyšující se osmotický tlak zbytkových roztoků způsobuje dehydrataci buněk. Tento proces, trvající asi 90–120 min je u vitrifikace nahrazen krátkým pobytem ve vitrifikačním médiu, jež svým složením připomíná zbytkové roztoky o teplotě asi -30 °C. Vzhledem k tomu, že tento krok probíhá při teplotách nad 0 °C, je dehydratace velmi rychlá. Důležitým předpokladem úspěchu vitrifikace je v této fázi zabránit masovému vstupu kryoprotektiv do buněk. Vzhledem k tomu, že množství penetrovaného kryoprotektiva je funkcí času a teploty expozice [Jackowski aj., 1980], nabízí se jako řešení právě ovlivnění těchto parametrů. Ani snížení teploty vitrifikačního média [Liehman, 1984; Rall a Fahy, 1985; Rall, 1987], ani extrémní zkrácení doby expozice [Scheffen aj., 1986; Massip aj., 1986] nepřináší optimální řešení, neboť způsobuje technické komplikace a neumožňuje kryokonzervaci embryí všech stádií a biologických druhů.

Naším cílem bylo opracování metody vitrifikace, zejména sestavení vitrifikačního média, jež by umožnilo kryokonzervaci embryí skotu, a to v co nejširším rozmezí vývojových stadií. Předpokládané použití v provozních podmínkách vyžadovalo, aby tento postup kryokonzervace nebyl technicky příliš náročný, nevyžadoval kontrolu teploty a umožňoval práci v co nejširším časovém rozpětí.

MATERIÁL A METODY

ZISK, KULTIVACE A PŘENOS EMBRYÍ

Vybrané krávy — dárkyně embryí — byly připravovány podle pokynu Technologický postup přenosu embryí skotu, vydaného Státním plemenářským podnikem, koncernový podnik, Praha. Stimulace spočívala v aplikaci 40 mg folikuly stimulujícího hormonu [FSH], rozdělených do čtyř dnů v osmi dávkách.

Nástup říje byl vyvolán aplikací Oestrophanu před ukončením podávání FSH. Krávy byly inseminovány a o sedm dní později byla embrya získána buď nechirurgickým výplachem děložních rohů nebo po zabití dárkyně výplachem izolovaných děložních rohů.

Po promytí v čerstvém kultivačním médiu byla vyřazena embrya degenerovaná, zpožděná ve vývoji, neoplozená vajíčka a embrya, u nichž byl počet buněk výrazně snížen degenerací některých blastomer. Ostatní embrya byla konzervována vitifikací.

Po rozmrazení a odmytí kryoprotektiv byla embrya třikrát promyta v čerstvém kultivačním médiu a buď kultivována po dobu 72 h při teplotě 38 °C, v atmosféře s 5 % CO₂ při 100% relativní vlhkosti nebo přenesena do synchronizovaných recipientů.

Jako kultivační médium sloužilo MEM doplněné 20 % fetálního telecího séra, kondicionované kultivovanými buňkami fetálního telecího endometria (Machatková aj., 1988).

Krávy a jalovice, které sloužily jako příjemkyně pro nechirurgický přenos embryí byly synchronizovány pomocí opakovaného podání Oestrophanu. Dva dny po jeho poslední aplikaci následovala říje a o dalších sedm dní později bylo provedeno rektální vyšetření. Příjemkyně, u kterých bylo zjištěno žluté tělísko v odpovídajícím stupni rozvoje, byly použity pro nechirurgický přenos rozmrazených embryí do ipsilaterálního děložního rohu. Březost byla vyšetřována rektální palpací mezi 60. a 90. dnem po říji.

SOLOŽENÍ VITRIFIKAČNÍHO MÉDIA

Základem pro naši práci bylo vitrificační médium, úspěšně používané pro kryokonzervaci osmiblastomerních myších embryí, kde jako kryoprotektivum sloužil glycerol v koncentraci 6,85 mol.l⁻¹ (50 % obj.) — Liehman, 1984; Liehman aj., 1990.

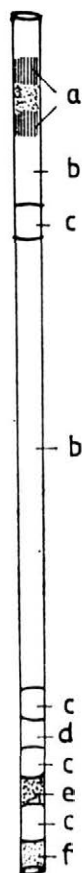
Při použití tohoto média bylo nutno provádět přípravu pro vitifikaci při teplotách blízkých 0 °C a tak zabránit masovému vstupu glycerolu do buněk. Navíc nezaručovalo uspokojivé přežívání embryí skotu. Proto jsme se rozhodli změnit jeho složení a obsah glycerolu doplnit nebo částečně nahradit jinými kryoprotektivy.

Bylo navrženo, většinou na základě literárních údajů o kryoprotektivních vlastnostech různých látek (Kasai aj., 1980, 1981; Miyamoto a Ishibashi, 1983; Rall aj., 1984; Rudolph a Crowe, 1985), více než 30 různých modifikací složení VM, u nichž byla vizuální kontrolou potvrzena stabilita v amorfním stavu během zmrazování a rozmrazování. Tato média byla orientačně vyzkoušena ke kryokonzervaci myších blastocyst (nepublikované výsledky), nejvhodnější kombinace kryoprotektiv byly použity pro vitifikaci embryí skotu (tab. I).

POSTUP VITRIFIKACE A ROZMRAZOVÁNÍ

Vybraná sedmidenní embrya skotu byla přenesena do ekvilibračního média s obsahem 1,37 mol.l⁻¹ (10 % obj.) glycerolu. Po přibližně 10 min ekvibrace v pokojové teplotě byla přenesena do vitrificačního média, a to při pokojové teplotě nebo při teplotě blízké 0 °C (na ledové lázni) — tab. II. Zbytky ekvilibračního média byly odstraněny dvojím oplachem ve vitrificačním médiu a embrya umístěna pomocí skleněné mikropipety do malého sloupce vitrificačního média v předem naplněné plastické dutince [0,25 ml, Cassou, Francie]. Zbytek dutinky byl naplněn roztokem sacharózy v koncentraci 1 mol.l⁻¹ (obr. 1). Dutinka byla uzavřena polyvinylalkoholem a postupně ponořena do kapalného dusíku. Mezi prvním přenesením do vitrificačního média a ochlazením na teplotu -196 °C uběhlo 60—120 sekund.

Po jednom až několika dnech skladování v kapalném dusíku byla embrya rozmrazena ponořením celé dutinky do vodní lázně o pokojové teplotě nebo do ledové lázně (0 °C), a to v závislosti na teplotě přípravy pro zmrazování (tab. II). Dutinka byla po rozmrazení jejího obsahu protřepána, čímž byly odstraněny bubliny mezi jednotlivými sloupci médií a došlo k jejich promísení. Za pět minut poté byl obsah dutinky vytlačen na petriho misku a embrya přenesena do roztoku sacharózy o koncentraci 0,5 mol.l⁻¹. Po dalších pěti minutách byla embrya opláchnuta v čerstvém kultivačním médiu a buď kultivována, nebo přenesena do synchronizovaných recipientek.



1. Schéma plnění pro vitrifikaci embryí skotu — A diagramme of filling for bovine embryo vitrification

- a — zátka — stopper
- b — sacharóza ($1,0 \text{ mol.l}^{-1}$) — saccharose (1.0 mol/l)
- c — vzduchová bublina — air bubble
- d — vitrifikační médium, které odstranilo sacharózu ($1,0 \text{ mol.l}^{-1}$) ze stěn dutinky — vitrification medium that removed saccharose (1.0 mol/l) from the walls of the tiny hollow
- e — vitrifikační médium s embryi — vitrification medium with embryos
- f — polyvinylalkoholová zátka — polyvinyl alcohol stopper

VÝSLEDKY A DISKUSE

Celkem 190 sedmidenních embryí skotu bylo vitrifikováno v pěti různých typech vitrifikačního média (tab. I) s následným rozmrazením a promísením s odmývacím médiem (1 mol.l^{-1} sacharózy) uvnitř dutinky. Z tohoto počtu se 55 embryí vyvíjelo (28,9 %) v podmínkách *in vitro*. Do tohoto počtu není zahrnuto 11 embryí, která se nepodařilo po rozmrazení nalézt, nebo která se ztratila v průběhu manipulace. Dalších 17 embryí bylo orientačně přeneseno připraveným příjemkyním, z nichž zabřezly tři (17,6 %).

Výsledky kultivace a přenosu embryí vitrifikovaných v jednotlivých typech médií jsou shrnuty v tab. II. Velice rozdílná početnost jednotlivých skupin byla způsobena zčásti tím, že jsme nepokračovali v práci s médii, která z jakýchkoliv důvodů nevyhovovala našim požadavkům a jsou v tab. I a II uvedena jen pro úplnost.

Vitrifikace embryí skotu v různých kombinacích glycerolu (případně metanolu) s nepenetrujícími kryoprotektivy (prolin, sacharóza) ukazuje, že je možno touto cestou dosáhnout nadějných výsledků. Použití vysokých koncentrací prolinu (40 % obj. roztoku o koncentraci $6,0 \text{ mol.l}^{-1}$)

I. Složení vitrificačních médií pro kryokonzervaci embryí skotu — Composition of vitrification media for bovine embryo cryopreservation

	Pracovní název média a jeho složení ¹ [obj. %]				
	VM1	VM2	VM3	VM4	VM5
Glycerol ²	50	25	30	50	30
Metanol ³	—	10	—	—	—
L-Prolin ⁴ 6,0 mol.l ⁻¹	—	—	40	20	—
Sacharóza ⁵ 2,0 mol.l ⁻¹	—	30	—	—	50
Bovinní sérum ⁶	20	30	30	30	20
Kultivační médium do 100 % ⁷					

¹working name of the medium and its composition, ²glycerol, ³methanol, ⁴L-proline 6.0 mol/l, ⁵saccharose 2.0 mol/l, ⁶bovine serum, ⁷culture medium to complement 100 %

II. Životaschopnost morul a blastocyst skotu po vitrifikaci v médiích různého složení — The viability of bovine morulas and blastocysts after vitrification in media of different composition

	Médium ¹				
	VM1*	VM2	VM3	VM4*	VM5
Počet embryí ²	60	10	77	18	25
Abnormální vývoj ³ <i>in vitro</i>	11	1	7	2	2
Normální vývoj ⁴ <i>in vitro</i>	9	5	16	11	14
%	15,0	50,0	20,7	61,1	56,0
Přeneseno embryí ⁵	9	1	7	—	—
Březí příjemkyně ⁶	1	1**	1	—	—
%	11,1		14,3	—	—

* příprava embryí pro vitrifikaci a rozmrazování byly vzhledem k vysoké koncentraci glycerolu prováděny při teplotě 0 °C — the embryos were prepared for vitrification and defreezing at a temperature of 0 °C with respect to the high glycerol concentration

** v červenci 1985 se narodilo první tele po přenosu embrya konzervovaného vitrifikací — in July 1985 the first calf was born after vitrified embryo transfer

¹medium, ²embryo number, ³abnormal development, ⁴normal development, ⁵number of transferred embryos, ⁶pregnant recipients

však snižuje podíl životaschopných embryí (16/77, tj. 20,7 %) v důsledku jeho toxicity (nepublikované výsledky), nižší podíl (20 % obj.) naproti tomu neumožňuje snížit množství glycerolu ve vitrificačním médiu pod hranici 30 % obj., umožňující práci při pokojové teplotě. V práci s médiem VM 4 jsme proto nepokračovali, přestože životaschopnost rozmrazených embryí byla uspokojivá (11/18, tj. 61,1 %).

Kombinace glycerolu a metanolu se sacharózou (VM 2) se zdá poskytovat nadějně výsledky (5/10, tj. 50 %), práce s médiem VM 2 je však poněkud komplikovaná, neboť médium v důsledku těkavosti metanolu mění v průběhu práce své složení a ztrácí požadovanou stabilitu v amorfním stavu. Zcela jiná je situace u kombinace glycerol-sacharóza, která umožňuje poměrně pohodlnou a technicky nenáročnou práci při pokojové teplotě. Vzhledem k tomu, že i dosažená životaschopnost embryí po rozmrazení je uspokojivá (14/25, tj. 56,0 %), bylo pro další práci vybráno vitrifikační médium VM 5.

Předběžné výsledky naší laboratoře využili ing. V. Landa, CSc., a ing. J. Říha, CSc., k dosažení výsledků, publikovaných v Živočišné výrobě č. 12, 1989. K serióznosti této práce by jistě přispělo, kdyby si ověřili přesné složení vitrifikačních médií, získávaných z naší laboratoře. Pak by se nemohlo stát, že v části II uvedli obsah 40 % prolinu, zatímco médium obsahovalo 40 % zásobního roztoku o koncentraci $6 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (tab. I).

První zpráva o úspěšné vitrifikaci embryí skotu, která jsou k působení vysokých koncentrací kryoprotektiv citlivější než embrya myši, je z roku 1986 (Massip aj., 1986). Při použití směsi 25 % obj. glycerolu a 25 % obj. 1,2 propandiolu dosáhli asi 40 % zabřezávání po přenosu morul a časných blastocyst. Doba pobytu embryí ve vitrifikačním médiu však nesmí přesáhnout 30 s a není možno tímto způsobem kryokonzervovat blastocysty. Srovnání tohoto postupu s klasickými metodami vyznívá ve prospěch pomalejšího zmrazování (Massip aj., 1987), bylo však provedeno na poměrně malém počtu embryí.

Novější zprávy (Vander Zwahlen aj., 1989) sice hovoří o možnosti vitrifikovat bovinní blastocysty, avšak za cenu technických komplikací, nutnosti udržovat teplotu vitrifikačního média na 4°C a s časovým limitem 30 s pobytu ve vitrifikačním médiu před zchlazením na teplotu kapalného dusíku.

Ve srovnání s těmito pracemi je námi navržená metodika technicky méně náročná a proto vhodnější k širokému praktickému použití, navíc všechna vývojová stadia sedmidenních embryí skotu přežívala v přibližně stejných proporcích. Od roku 1988 je tato metodika používána v praxi přenosu embryí středočeského KPP.

Získané zkušenosti byly shrnuty a zobrazeny v žádosti o udělení autorského osvědčení, které je přihlášeno u Federálního úřadu pro vynálezy pod číslem 5757-88.

Literatura

- BIERY, K. A. — SEIDEL, G. E. Jr. — ELSDEN, R. P.: Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 25, 1985, s. 140.
- BOUYSSOU, B. — CHUPIN, D.: Two step freezing of cattle blastocysts in French straws. *Theriogenology*, 17, 1982a, s. 80.
- BOUYSSOU, B. — CHUPIN, D.: Two step freezing of cattle blastocysts with dimethylsulfoxide (DMSO) or glycerol. *Theriogenology*, 17, 1982b, s. 159—166.
- ELSDEN, R. P. — SEIDEL, G. E. Jr. — TAKEDA, T. — FARRAND, G. D.: Field experiments with frozen-thawed bovine embryos transferred nonsurgically. *Theriogenology*, 17, 1982, s. 1—10.
- FAHY, G. M. — MAC FARLANE, D. R. — ANGELL, C. A. — MERYMAN, H. T.: Vitrication as an approach to cryopreservation. *Cryobiology*, 21, 1984, s. 407—426.
- JACKOWSKI, S. C. — LEIBO, S. P. — MAZUR, P.: Glycerol permeabilities of fertilized and unfertilized mouse ova. *J. exp. Zool.*, 212, 1980, s. 329—341.

- KASAI, M. — NIVA, K. — IRITANI, A.: Survival of mouse embryos frozen and thawed rapidly. *J. reprod. Fert.*, 59, 1980, s. 51—56.
- KASAI, M. — NIVA, K. — IRITANI, A.: Effects of various cryoprotective agents on the survival of unfrozen and frozen mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 63, 1981, s. 175—180.
- KRAG, K. T. — KOEHLER, I. M. — WRIGHT, R. W. Jr.: A method for freezing early murine embryos by plunging directly into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 23, 1985a, s. 199.
- KRAG, K. T. — KOEHLER, I. M. — WRIGHT, R. W. Jr.: Trehalose: a nonpermeable cryoprotectant for direct freezing of early stage murine embryos. *Theriogenology*, 23, 1985b, s. 200.
- LEHN-JENSEN, H. — GREVE, T.: Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves. *Nord. Veter.-Med.*, 33, 1981, s. 523—529.
- LEHN-JENSEN, H. — GREVE, T.: Survival of cow blastocysts utilizing short freezing curves after plunging between -15 and -60°C and rapid thawing. *Theriogenology*, 17, 1982, s. 95.
- LIEBO, S. P. — WEST, A. W. — PERRY, B.: A one-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. I. Basic studies. *Cryobiology*, 19, 1982, s. 573.
- LIEHMAN, P.: Využití nízkých teplot při dlouhodobé konzervaci embryí savců. [Kandidátská disertace.] Liběchov, 1984. — Ústav fyziologie a genetiky hospodářských zvířat.
- LIEHMAN, P. — TEPLÁ, O. — FULKA, J.: Vitrification of 8-cell mouse embryos with glycerol as a cryoprotectant. *Folia biol. (Praha)*, 36, 1990, s. 240—251.
- MACHATKOVÁ, M. — PETELÍKOVÁ, J. — HORKÝ, F. — JOKEŠOVÁ, M.: Porovnání účinnosti různých médií ke kultivaci raných embryí skotu. In: Čtrnácté dny fyziologie hospodářských zvířat, 1.—3. 6. 1988, Brno.
- MASSIP, A. — VAN DER ZWALMEN, P. — ECTORS, F.: Recent progress in cryopreservation of cattle embryos. *Theriogenology*, 27, 1987, s. 69—79.
- MASSIP, A. — VAN DER ZWALMEN, P. — SCHEFFEN, B. — ECTORS, F.: Pregnancies following transfer of cattle embryos preserved by vitrification. *Cryo-Letters*, 7, 1986, s. 270—273.
- MIYAMOTO, H. — ISHIBASHI, T.: Survival of mouse embryos frozen-thawed slowly or rapidly in the presence of various cryoprotectants. *J. exp. Zool.*, 226, 1983, s. 123—129.
- NIEMANN, H. — SACHER, B. — SCHILLING, E. — SMIDT, D.: Improvement of survival rates of bovine blastocysts with sucrose for glycerol dilution after a fast freezing and thawing method. *Theriogenology*, 17, 1982, s. 102.
- RALL, V. F.: Factors affecting the survival of mouse embryos cryopreserved by vitrification. *Cryobiology*, 24, 1987, s. 387—402.
- RALL, W. F. — FAHY, G. M.: Ice-free cryopreservation of mouse embryos at -196°C by vitrification. *Nature (London)*, 313, 1985, s. 573—575.
- RALL, W. F. — CZLONKOWSKA, M. — BARTON, S. C. — POLGE, C.: Cryoprotection of day-4 mouse embryos by methanol. *J. Reprod. Fert.*, 70, 1984, s. 293—300.
- RENARD, J. P. — HEYMAN, Y. — OZIL, J. P.: Congélation de l'embryon bovin: une nouvelle méthode de décongélation pour le transfert cervical d'embryons conditionnés seule fois en palettes. *Ann. Méd. vét.*, 126, 1982, s. 23—32.
- RUDOLPH, A. S. — CROVE, J. H.: Membrane stabilization during freezing: the role of two natural cryoprotectants, Trehalose and Proline. *Cryobiology*, 22, 1985, s. 367—377.
- SCHEFFEN, B. — VAN DER ZWALMEN, P. — MASSIP, A.: A simple and efficient procedure for preservation of mouse embryos by vitrification. *Cryo-Letters*, 7, 1986, s. 260—269.
- SZÉLL, A. — SHELTON, J. N.: Sucrose dilution of glycerol from mouse embryos frozen rapidly in liquid nitrogen vapour. *J. Reprod. Fert.*, 76, 1986a, s. 401—408.
- SZÉLL, A. — SHELTON, J. N.: Role of equilibration before rapid freezing of mouse embryos. *J. reprod. Fert.*, 78, 1986b, s. 699—703.
- SZÉLL, A. — SHELTON, J. N.: Osmotic and cryoprotective effects of glycerol-sucrose solutions on day-3 mouse embryos. *J. Reprod. Fert.*, 80, 1987, s. 309—316.
- TAKEDA, T. — ELSDEN, R. P. — SEIDEL, G. E. Jr.: Cryopreservation of mouse embryos by direct plunging into liquid nitrogen. *Theriogenology*, 21, 1984, s. 266.
- VAN DER ZWALMEN, P. — TOUATI, K. — ECTORS, F. J. — MASSIP, A. — BECKERS, J. F. — ECTORS, F.: Vitrification of bovine blastocysts. *Theriogenology*, 31, 1989, s. 270.
- WILLADSEN, S. M. — POLGE, C. — ROWSON, L. E. A.: The viability of deep frozen cow embryos. *J. Reprod. Fert.*, 52, 1972, s. 391—393.

WILLIAMS, T. J. — JOHNSON, S. E.: Quick-freezing of day four mouse embryos. *Theriogenology*, 23, 1985, s. 235.

Došlo dne 19. 10. 1990

LIEHMAN, P. [Institute of Physiology of the Czechoslovak Academy of Sciences, Praha]: *Comparison of different cryopreservation media for vitrification of seven-day bovine embryos*. *Veter. Med. [Praha]*, 36, 1991 [10]: 585—592.

A vitrification medium, attested for cryopreservation of mouse eight-blastomere embryos (6.85 mol/l glycerol as a cryoprotective agent), was checked up with respect to preservation of bovine seven-day morulas and blastocysts. As this medium was not found to be convenient either as to its technical parameters or the reached embryo survival, its composition was modified. The glycerol content was complemented or partly replaced by other cryoprotectives (methanol, saccharose, L-proline). A comparison of technical parameters and viability of rewarmed embryos shows that our requirements (technically simple technique of freezing and rewarming and good survival) are met in the best way by a cryoprotective combination of 4.11 mol/l glycerol and 1.0 mol/l saccharose. The total of 54.5 % embryos developed in *in-vitro* conditions following vitrification in the medium of this composition and after rewarming.

bovine embryos; vitrification; vitrification media

Adresa autora:

Ing. Pavel Liehman. Fyziologický ústav ČSAV, Vídeňská 1083, 142 20 Praha 4.

A. Rybníkář, V. Vrzal, J. Chumela

RYBNÍKÁŘ, A. — VRZAL, V. — CHUMELA, J. (Bioveta, Ivanovice na Hané): *Minimální efektivní dávky vakcíny proti trichofytóze skotu*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 593—597.

V pokusech na telatech bylo zjištěno, že minimální efektivní dávky vakcíny proti trichofytóze skotu lyofilizované a vakcíny proti trichofytóze skotu avirulentní obsahovaly 1,5 miliónu CFU (colony forming units) výrobního kmene *Trichophyton verrucosum*. To představuje asi desetinásobně nižší množství, než je praktické ředění těchto biopreparátů. Po dvourázové *i. m.* aplikaci uvedených dávek došlo u pokusných zvířat ke vzniku solidní imunity vůči experimentální infekci trichofytózou. Telata, vakcinovaná $100\times$ a $1000\times$ ředěnou komerční vakcínou, dostatečnou chráněnost proti této infekci neprokázala.

tele; *Trichophyton verrucosum*; vakcinace; imunizační dávky; čelenž

Problematikou vzniku a délky imunity po vakcinaci skotu proti trichofytóze jsme se zabývali v předchozích sděleních (Rybníkář aj., 1989a, b). V dalších pokusech jsme porovnávali protekční schopnosti dvou komerčně vyráběných československých imunobiologických přípravků, vakcíny proti trichofytóze skotu lyofilizované a vakcíny proti trichofytóze skotu avirulentní (Rybníkář aj., 1986). Otázky studia denzity minimálních efektivních vakcinačních dávek uvedených přípravků nebyly dosud publikovány a jsou námětem tohoto sdělení.

MATERIÁL A METODA

Pokusy byly provedeny na jednoměsíčních telatech plemena české strakaté, nacházejících se v dobrém výživném a zdravotním stavu. K imunizaci byla použita vakcína proti trichofytóze skotu lyofilizovaná a vakcína proti trichofytóze skotu avirulentní (výrobce Bioveta, Ivanovice na Hané) v následujících dávkách vegetativních forem výrobního kmene na tele: 2×15 miliónů (ředění podle návodu k použití = základní ředění), $2 \times 1,5$ miliónu, 2×150 tisíc a 2×15 tisíc. Uvedené dávky vakcín byly aplikovány *i. m.* do pánevní svaloviny v objemu $2,5 \text{ cm}^3$ dvakrát s intervalem 12 dnů mezi vakcinací a revakcinací. Počet aplikovaných vegetativních forem ve vzorcích vakcíny byl zjišťován plotnovou diluční metodou výsevem na Sabouraudův agar.

Po 28 dnech od revakcinace byla vakcinovaná telata a skupina nevakcinovaných kontrolních telat epikutánně čelenžována. Suspenze čelenžní virulentní kultury *Trichophyton verrucosum* byla inokulována (vetření pomocí gumové zátky) v množství 4 milióny (tab. I), resp. 8 miliónů (tab. II) konidí na plochu $10 \times 10 \text{ cm}$ ostříhané, jemně skarifikované pokožky zvířat.

Profylaktická účinnost uvedených logaritmičsky ředěných vakcín byla hodnocena porovnáním klinických kožních změn v místě inokulace čelenžní kultury. Sledování bylo ukončeno 35. den po čelenži. Případné kožní změny u pokusných zvířat v době ukončení pokusu byly vyšetřovány kultivačně a mikroskopicky.

VÝSLEDKY

Profylaktický efekt obou testovaných vakcín v základním ředění byl velmi dobrý (tab. I a II). Kožní změny u telat těchto skupin po čelenži

I. Zjišťování minimálních efektivních dávek vakcíny proti trichofytóze skotu lyofilizované — Determination of minimum effective doses of lyophilized vaccine against bovine trichophytosis

Pokusná skupina ¹	Číslo telate ⁷	Kožní mykotické změny v místě inokulace čelenžní kultury <i>T. verrucosum</i> , dny po čelenži ⁸				
		15. den ⁹	18. den ¹⁰	21. den ¹¹	25. den ¹²	35. den ¹³
Nevakcinované kontroly ²	072	+	++	+++	+++	+++
	076	++	+++	+++	+++	+++
	543	+	++	+++	+++	+++
	691	+	+	++	++	++
	692	+	++	++	++	+
	693	+	++	++	++	++
	883	±	++	++	++	++
Vakcinace 2 × 15 tis. CFU na tele ³	049	+	++	++	++	+++
	059	++	+++	+++	+++	++
	505	++	++	++	++	+
	507	++	++	++	++	+
	668	++	++	++	++	+
	672	+	++	++	+	+
Vakcinace 2 × 150 tis. CFU na tele ⁴	046	±	+	++	++	++
	047	—	—	—	—	—
	050	+	+	++	++	+
	052	±	+	+	±	—
	053	±	+	++	++	++
	116	—	—	—	—	—
	671	+	+	+	+	+
Vakcinace 2 × 1,5 mil. CFU na tele ⁵	042	±	—	—	—	—
	054	±	—	—	—	—
	112	—	—	—	—	—
	114	—	—	—	—	—
	115	—	—	—	—	—
	503	—	—	—	—	—
	669	—	—	—	—	—
Vakcinace 2 × 15 mil. CFU na tele ⁶	043	±	—	—	—	—
	048	±	—	—	—	—
	051	—	—	—	—	—
	111	—	—	—	—	—
	661	—	—	—	—	—
	664	—	—	—	—	—
	667	—	—	—	—	—

¹test group, ²nonvaccinated controls, ³vaccination with 2 × 15 thous. CFU per calf, ⁴vaccination with 2 × 150 thous. CFU per calf, ⁵vaccination with 2 × 1,5 mil. CFU per calf, ⁶vaccination with 2 × 15 mil. CFU per calf, ⁷calf no., ⁸dermal mycotic lesions at the spot of inoculation of challenge culture of *T. verrucosum*, days after challenge, ⁹15th day, ¹⁰18th day, ¹¹21st day, ¹²25th day, ¹³35th day

II. Zjišťování minimálních efektivních dávek vakcíny proti trichofytóze skotu avirulentní — Determination of minimum effective doses of avirulent vaccine against bovine trichophytosis

Pokusná skupina ¹	Číslo telete ⁷	Kožní mykotické změny v místě inokulace čelenžní kultury <i>T. verrucosum</i> , dny po čelenži ⁸				
		15. den ⁹	18. den ¹⁰	21. den ¹¹	25. den ¹²	35. den ¹³
Nevakcinované kontroly ²	737	+++	+++	+++	+++	+++
	739	+	+	+++	+++	+++
	743	+	+	++	+++	+++
	747	++	+++	+++	+++	+++
	933	+	++	++	+++	+++
	934	+	+	++	++	+++
	935	+	++	++	+++	+++
	936	±	+	+	++	++
Vakcinace 2 × 15 tis. CFU na tele ³	676	—	+	+	+++	++
	719	—	+	++	+++	+++
	724	++	+++	++	+++	+++
	725	+	+++	++	++	+++
	919	±	+	+	++	+
	920	—	+	+	++	++
	922	—	±	+	+	++
	923	+	+	++	++	+++
Vakcinace 2 × 150 tis. CFU na tele ⁴	605	—	—	—	—	—
	606	+	+	—	—	—
	677	+	±	—	—	—
	678	±	±	±	—	—
	679	—	—	—	—	—
	721	++	++	++	++	++
	722	+	±	—	—	—
	921	—	+	+	++	++
Vakcinace 2 × 1,5 mil. CFU na tele ⁵	723	—	—	—	—	—
	726	±	±	—	—	—
	727	±	—	—	—	—
	728	—	—	—	—	—
	729	+	+	±	—	—
	730	+	±	±	—	—
	924	—	±	±	±	—
	926	+	+	±	—	—
Vakcinace 2 × 15 mil. CFU na tele ⁶	608	—	—	—	—	—
	731	—	—	—	—	—
	733	±	±	—	—	—
	734	±	±	—	—	—
	927	—	—	—	—	—
	928	—	—	—	—	—
	929	±	—	—	—	—
	930	+	±	±	—	—

For 1—13 see Tab. I

Vysvětlivky k tab. I a II — Explanatory notes to Tab. I and II:

- bez klinických kožních mykotických změn — without clinical dermal mycotic lesions
- ± drobné kožní změny — small dermal lesions
- ojedinelá mykotická ložiska — sporadic mycotic lesions
- ++ více než deset mykotických ložisek s tendencí splývání — more than ten mycotic lesions tending to merge
- +++ splývání ložisek v souvislé krusty — merging of lesions into continuous crusts

nebyly vůbec zjištěny nebo byly jen nevýrazné a krátkodobé. Podobně tomu bylo u zvířat imunizovaných vakcínami v desetinásobně nižším ředění ($2 \times 1,5$ miliónu CFU na tele). V případě použití vakcín v ředění 10^{-2} nebylo spolehlivé protekce ve všech případech dosaženo. U čtyř telat ze sedmi vakcinovaných vakcínou proti trichofytóze skotu lyofilizovanou a u dvou telat z osmi vakcinovaných avirulentní vakcínou ve stonásobně nižším ředění došlo po čelení k onemocnění trichofytózou. Po imunizaci dávkami 2×15 tisíc vegetativních forem (ředění 10^{-3}) jsme zjevné trichofytické změny po čelení pozorovali u všech telat. Rozsah mykotických ložisek u těchto zvířat byl prakticky stejný jako u nevakcinovaných kontrol — došlo ke vzniku šupin a krust a k vypadávání chlupů téměř po celé ploše infekce. Mikroskopické a kultivační vyšetření těchto změn bylo pozitivní, čelení kmen *T. verrucosum* byl rekultivován.

DISKUSE

Vakcinace skotu proti trichofytóze byla jako významné epizootologické opatření zavedena v řadě zemí Východní i Západní Evropy (Sarkisov a Kolesnikov, 1989). Mezi prvními z nich bylo Československo, kde jsou v posledním desetiletí k imunizaci používány dva imunobiologické přípravky tuzemské výroby: vakcína proti trichofytóze skotu lyofilizovaná a vakcína proti trichofytóze skotu avirulentní. Účinnou složkou obou přípravků jsou živé lyofilizované mikrokonidie výrobních kmenů *T. verrucosum*. Vysoká profylaktická efektivnost těchto vakcín, aplikovaných v praktickém ředění podle návodu k použití, byla v laboratorních pokusech i v terénní praxi prokázána (Otčenášek aj., 1981; Rybníkář aj., 1986, 1989a; Sahal aj., 1988). S údaji o zjišťování nejnižších efektivních dávek vakcíny proti trichofytóze skotu jsme se v odborném tisku dosud nesetkali.

Nejnižší povolený počet vegetativních forem vakcinačního kmene je u obou námi vyráběných vakcín proti trichofytóze skotu podle platných podnikových norem 2,5 miliónu CFU (colony forming units) v 1 cm^3 . U většiny expedovaných šarží vakcín se však množství životaschopných elementů *T. verrucosum* v 1 cm^3 pohybuje mezi 3 až 8 milióny CFU. Proto jsme jako základní ředění zvolili v našich experimentech denzitu 6 miliónů CFU v 1 cm^3 . Profylaktické dávky u telat ve věku 1–3 měsíce představují $2,5 \text{ cm}^3$ vakcíny. V našem případě byla tedy základní vakcinační dávka 15 miliónů CFU na jedno tele.

Výsledky našich pokusů ukázaly dobrou protekční účinnost u obou vakcín, použitých v základním ředění a v ředění 10^{-1} . Chráněnost telat proti experimentální infekci po imunizaci stokrát nižšími dávkami proti základnímu ředění nebyla již dostatečná, některá telata onemocněla po čelení trichofytózou. U zvířat, vakcinovaných tisíckrát nižšími dávkami, nebyl ochranný účinek vakcín použitou metodou zjištěn. Rozsah trichofytických změn u takto vakcinovaných telat byl prakticky stejný jako u nevakcinovaných kontrol.

Poznatek, že po vakcinaci skotu vakcínou proti trichofytóze došlo ke vzniku solidní imunitní odpovědi i při aplikaci desetkrát nižších dávek základního ředění, by mohl svádět k zavedení „úsporných“ opatření. Použití snížených dávek uvedených vakcín však vzhledem k široké antigenní heterogenitě původců trichofytózy skotu, kmenů *T. verrucosum*, ke specifickým podmínkám odchovu skotu v různých lokalitách naší repub-

liky, zvýšené frekvenci imunosupresivních vlivů u zvířat a dalším negativním faktorům nedoporučujeme.

Výsledky, kterých jsme dosáhli v našich pokusech, jsou příspěvkem k řešení problematiky optimálních vakcinačních dávek antimykotických vakcín. Experimentálně potvrzují údaje Šišáka (1981), že československá vakcína proti trichofytóze skotu je vakcínou vysoce účinnou s dostatečnou rezervou antigenu v imunizační dávce.

Literatura

- OTČENÁŠEK, M. — ŠTROS, K. — KOMÁREK, J. — TOMŠÍKOVÁ, A. — RAŠKOVÁ, H. — HAMÁČEK, F.: Zkušenosti s vakcinací skotu proti trichofytóze při prevenci a tlumení dermatofytických zoonóz. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981, s. 193—202.
- RYBNÍKÁŘ, A. — CHUMELA, J. — VRZAL, V.: Ověřování protekčních schopností avirulentní vakcíny proti trichofytóze skotu. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986, s. 219—226.
- RYBNÍKÁŘ, A. — CHUMELA, J. — VRZAL, V.: Vznik imunity po vakcinaci skotu proti trichofytóze. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989a, s. 97—100.
- RYBNÍKÁŘ, A. — VRZAL, V. — CHUMELA, J. — KRUPKA, V. — DVOŘÁK, R. — PETRÁŠ, J.: Délka imunity po vakcinaci skotu proti trichofytóze. *Veterinářství*, 39, 1989b, s. 435—436.
- SAHAL, M. — IMREN, H. Y. — BÖRKÜ, M. K. — YARDIMCI, H.: Türkiye'de sigirlarda trichophytie enfeksiyonuna karsi ilk avirulent asi uygulamalari. *A. Ü. Veter. Fak. Derg.*, 35, 1988, s. 567—587.
- SARKISOV, A. Ch. — KOLESNIKOV, A. JA.: Osnovnye puti iskorenenija dermatomikozov. *Veterinarija (Moskva)*, 1989, (12), s. 36—38.
- ŠIŠÁK, M.: Trichofytóza skotu v ČSSR — po 5 letech od zavedení plošné specifické imunoprofylaxe. *Veterinářství*, 31, 1981, s. 536—537.

Došlo dne 17. 9. 1990

RYBNÍKÁŘ, A. — VRZAL, V. — CHUMELA, J. (Bioveta, Ivanovice na Hané): *Minimum effective doses of vaccine against bovine trichophytosis*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (10): 593—597.

Calves at the age of one month were vaccinated with a lyophilized vaccine against bovine trichophytosis, or with an avirulent vaccine against bovine trichophytosis (mfd by Bioveta, Ivanovice na Haná). Prophylactic doses of the vaccines (15 mil. CFU of production strain *Trichophyton verrucosum* per calf) were used for immunization, and doses 10 times, 100 times and 1000 times lower. The calves were revaccinated with the same doses in 12 days after the first vaccination. Twenty-eight days later since revaccination, the vaccinated calves and a group of control nonvaccinated calves was challenged epicutaneously with a virulent strain of *T. verrucosum*. The protectiveness of both vaccines implanted at doses of 2×15 mil. and 2×1.5 mil. CFU per test animal was very good (Tabs. I and II). No dermal lesions were observed in the challenged calves of these groups, or if any, they were not clear and could be observed for a short time. If the vaccines were used diluted at a ratio 10^{-2} (150 thousand CFU of production strain), trichophytic lesions persisting for the whole period of observation were found in four of the seven calves vaccinated with a lyophilized vaccine against bovine trichophytosis and in two of the eight calves implanted an avirulent vaccine after challenge. Mycotic lesions were formed after challenge in all test animals in the groups vaccinated with doses of 2×15 thousand CFU of production strain per calf. The extent of these lesions was practically the same as in all nonvaccinated controls — on the surface of infected skin the hair was shed and scales and crusts were formed. A challenge strain of *T. verrucosum* was cultivated from these lesions.

calf; *Trichophyton verrucosum*; vaccination; immunization doses; challenge

Adresa autorů:

RNDr. Alois Rybníkář, MVDr. Vladimír Vrzal, MVDr. Josef Chumela, Bioveta, Komenského 212, 683 23 Ivanovice na Hané

Upozornění pro přispěvatele a čtenáře časopisu

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Pro lepší zpřístupnění výsledků československého výzkumu zahraničním odběratelům rozhodla redakční rada časopisu Veterinární medicína počínaje ročníkem 1991 uveřejňovat rozšířené, podrobně zpracované (s odkazy na tabulky a obrázky) souhrny v angličtině. Od ročníku 1992 budou tyto souhrny podmínkou pro přijetí příspěvků do tisku.

Proto žádáme autory našeho časopisu, aby příspěvky zasílané do redakce vybavili kratším souhrnem, který bude publikován v češtině či slovenštině, a dále delším souhrnem (v rozsahu do dvou rukopisných stran), který bude přeložen do angličtiny. Doufáme, že se toto opatření setká s příznivým ohlasem jak u autorů, tak i u čtenářů našeho časopisu.

Redakce časopisu

ZMĚNY KONCENTRACE LIPIDŮ V KREVNI PLAZMĚ U BŘEZÍCH PRASNIC

D. Ježková, M. Smrčková

JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. [Vysoká škola veterinární, Brno]: *Změny koncentrace lipidů v krevní plazmě u březích prasnic*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 (10): 599—606.

V pokusech na 10 prasnicích, křížencích plemen bílé ušlechtilé a landrace, ve věku 2—3 let a držení na definovaném krmeném režimu, jsme sledovali před a v průběhu březosti (1.—40., 41.—60., 61.—80., 81.—100. a 101.—120. den) změny velikosti plazmatického objemu (PO) a v krevní plazmě změny koncentrací triglyceridů, cholesterolu, celkových lipidů, β -lipoproteinů a fosfolipidů. PO u nebřezích prasnic činí $9,8 \pm 0,33$ l. Po poklesu na $7,8 \pm 0,33$ l ($p < 0,01$) v prvních 40 dnech březosti se v dalších sledovaných údobích zvětšuje a činí na konci gravidity $15,4 \pm 0,19$ l ($p < 0,001$). Celková lipémie v průběhu březosti prasnic klesá z $2,80 \pm 0,054$ g.l⁻¹ u nebřezích na $2,49 \pm 0,245$ g.l⁻¹ u prasnic na konci gravidity. Klesá i koncentrace cholesterolu v krevní plazmě z $2,48 \pm 0,53$ mmol.l⁻¹ u nebřezích na $1,88 \pm 0,173$ mmol.l⁻¹ ($p < 0,001$) u prasnic na konci březosti, β -lipoproteinů (z $3,95 \pm 1,134$ g.l⁻¹) u nebřezích na $3,47 \pm 0,199$ g.l⁻¹ u prasnic v 81.—100. dni březosti ($p < 0,05$), fosfolipidů v prvních 60 dnech březosti (z $1,62 \pm 0,079$ mmol.l⁻¹ před inseminací na $1,29 \pm 0,05$ mmol.l⁻¹ u prasnic 41—60 dnů březích). Koncentrace triglyceridů v krevní plazmě v průběhu březosti prasnic stoupá z $0,42 \pm 0,016$ mmol.l⁻¹ u zvířat nebřezích na $0,57 \pm 0,098$ mmol.l⁻¹ u samic vysokobřezích ($p < 0,02$). V prvních 40 dnech březosti však klesá jejich koncentrace na $0,39 \pm 0,036$ mmol.l⁻¹, v dalším údobí gravidity stoupá a dosahuje u prasnic březích 101—120 dnů nejvyšší koncentrace. Zvětšení PO prasnic v závěru gravidity vyjadřuje i zvětšení absolutního množství jak celkových lipidů, tak i cholesterolu, β -lipoproteinů a fosfolipidů 1,2—1,4krát, triglyceridů 2,1krát. Změny tukových komponent v krevní plazmě v průběhu březosti prasnic jsou porovnány s nálezy o změnách těchto látek v krevní plazmě během gravidity u jiných živočišných druhů.

prasnice; březost; krevní plazma; lipidy

V našich dřívějších studiích jsme prokázali, že v průběhu březosti prasnic dochází ke zvětšení velikosti plazmatického objemu (Ježková aj., 1977a, 1978a), zvyšuje se glukozémie (Ježková aj., 1978a, b), proteinémie (Ježková a Padalíková, 1977a, b) a dochází k nápadným změnám jak v celkové aminoacidémii, tak i v zastoupení jednotlivých volných aminokyselin v krevní plazmě (Ježková a Padalíková, 1977a, b; Ježková aj., 1977b).

Selata se rodí ve srovnání s mláďaty jiných živočišných druhů, např. králíka (5,8 %) a ovce (3 %), ale především člověka (16 %), prakticky

bez zásobního tuku; obsah tuku v těle selete po narození činí pouze 1,1 procenta (Spray a Widdowson, 1950; Manners a McCrea, 1963; Ježková, 1962, 1969). Hlavní energetickou rezervou selat v průběhu rození je glykogen (Ježková aj., 1978b). Po narození využívá sele tuk nabízené vysokotuké diety — mateřského kolostra i později mléka — velmi snadno a vytváří v těle v průběhu prvních 6 až 11 dnů po narození třikrát, popř. desetkrát větší množství tuku vzhledem k obsahu tuku v těle při narození (Ježková, 1962, 1969). Energeticky napjatá situace selat v perinatálním údobí (Ježková aj., 1978b) je nepochybně průvodním jevem nejen omezených rezerv glykogenových, vyvíjejících se funkcí glukoneogeneze (Seidel aj., 1976; Pégorier aj., 1982), ale i nízkých zásob tuku v těle.

Tyto funkční zvláštnosti selat nás vedly k otázce, zda a jak se mění koncentrace tuků v krevní plazmě prasnic v průběhu březosti. Informace v tomto směru jsou u březích samic i gravidních žen skromné (Ahlfeld, 1877; Goldwater a Stetten, 1947; Popjak a Beeckmans, 1950; McBride a Korn, 1964; Leat, 1966; Hytten a Leitchová, 1969; Hull, 1974), nicméně u prasnic chybějí úplně.

MATERIÁL A METODY

Do pokusu jsme zařadili 10 prasnic, kříženců plemen bílé ušlechtilé a landrace ve věku 2–3 let. Prasnice byly drženy a krmeny způsobem, který jsme popsali dříve (Ježková aj., 1990). Těsně před inseminací jsme u nich proměřili velikost plazmatického objemu (PO) způsobem uvedeným ve sdělení Ježková aj. (1977a). V krevní plazmě jsme stanovili koncentraci celkových lipidů, triglyceridů, cholesterolu (Bio-La-Test Celkové lipidy, Bio-La-Test Triglyceridy (triacylglyceroly), Bio-La-Test Cholesterol), dále β -lipoproteinů (Burstein a Samaille, 1958) a fosfolipidů (Richterich, 1969). Změny plazmatického objemu a uvedené parametry krevní plazmy jsme sledovali u prasnic 1.–40., 41.–60., 61.–80., 81.–100. a 101.–120. den březosti. Krev jsme odebírali zvířatům na lačno po 15hodinové přestávce v krmení punkcí z *vena cava cranialis*.

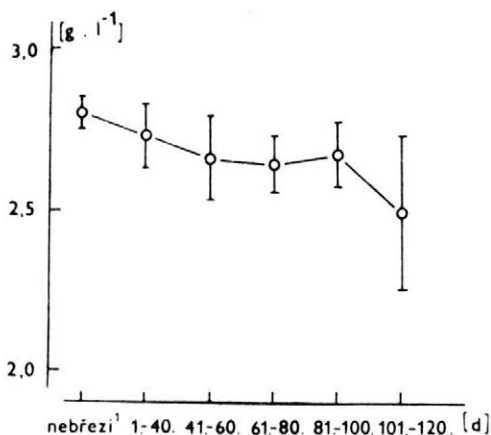
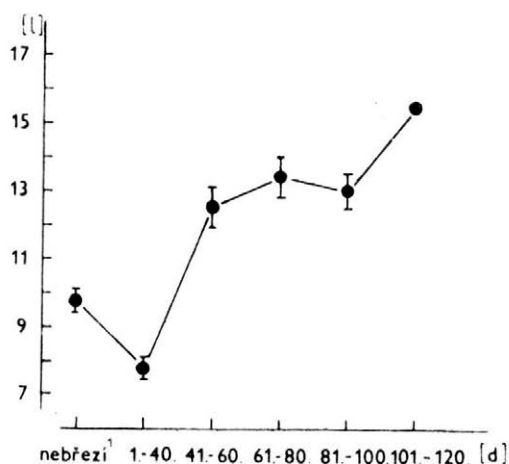
VÝSLEDKY

U nebřezích prasnic činí velikost plazmatického objemu $9,8 \pm 0,33$ l. V průběhu prvních 40 dnů statisticky průkazně klesá a činí $7,8 \pm 0,33$ l ($p < 0,01$). V dalších údobích březosti se plazmatický objem zvětšuje; v posledním údobí březosti je vůbec nejvyšší a činí $15,4 \pm 0,19$ l. Diference velikosti plazmatických objemů ve sledovaných časových údobích mezi 1.–40. a 41.–60., 61.–80., 81.–100. a 101.–120. dnem březosti jsou vysoce statisticky průkazné ($p < 0,001$). Statisticky vysoce průkazný je i vzestup PO u prasnic v údobích mezi 41.–60. a 101.–120. dnem březosti ($p < 0,01$) a dále mezi 61.–80. a 101.–120. ($p < 0,05$) i mezi 81.–100. a 101.–120. dnem březosti ($p < 0,01$) — obr. 1.

Celkové lipémie v průběhu březosti prasnic klesá. U nebřezích prasnic činí $2,80 \pm 0,054$ g.l⁻¹ a klesá u prasnic v posledním údobí březosti na $2,49 \pm 0,245$ g.l⁻¹. Diference těchto veličin mezi sledovanými údobími březosti statisticky významné nejsou (obr. 2).

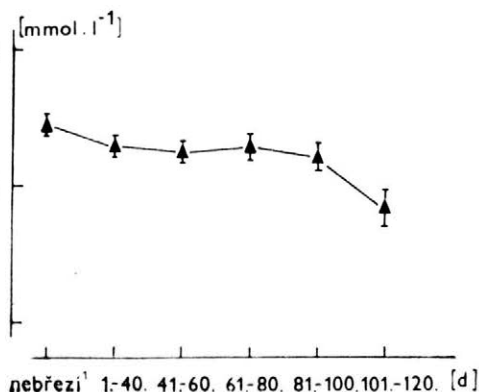
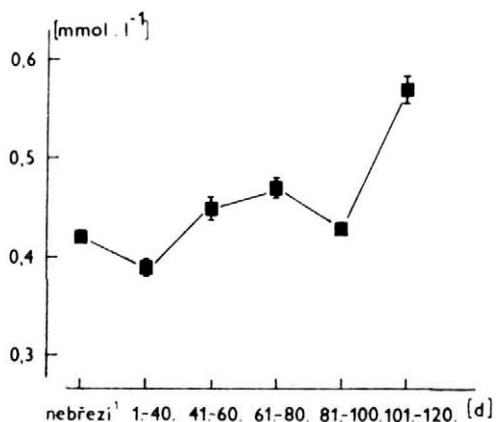
Koncentrace triglyceridů v krevní plazmě se u březích prasnic zvyšuje. U prasnic nebřezích činí $0,42 \pm 0,016$ mmol.l⁻¹, potom v prvních 40 dnech březosti mírně klesá na $0,39 \pm 0,036$ mmol.l⁻¹, nicméně v dalším údobí, tj. ve 41.–60., 61.–80. popř. i v 81.–100. dnu stoupá a nejvyšší koncentrace dosahuje v posledních dvaceti dnech březosti, kdy činí $0,57$

$\pm 0,098 \text{ mmol.l}^{-1}$. Diference mezi koncentrací triglyceridů v krevní plazmě u nebřezích a 101–120 dnů březích prasnic jsou statisticky průkazné ($p < 0,02$) — obr. 3.



1. Změny objemu krevní plazmy u prasnic v průběhu březosti — Variations of blood plasma volume in sows during their pregnancy
¹nonpregnant

2. Změny koncentrace celkových lipidů v krevní plazmě u prasnic v průběhu březosti — Variations of total lipid concentrations in the blood plasma of sows during their pregnancy
¹nonpregnant



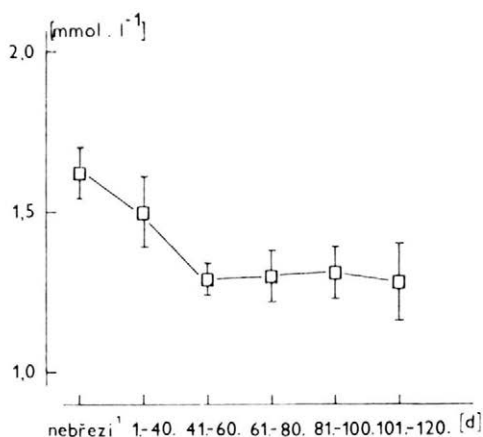
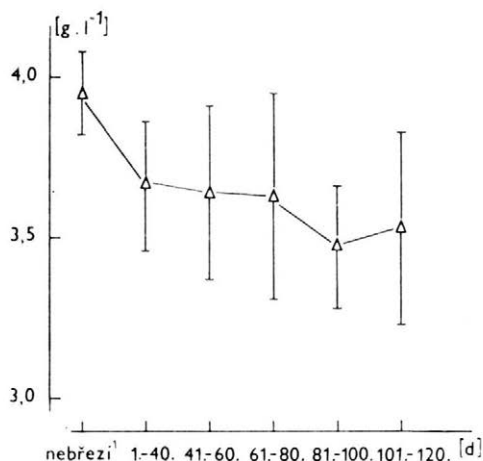
3. Změny koncentrace triglyceridů v krevní plazmě u prasnic v průběhu březosti — Variations of triglyceride concentrations in the blood plasma of sows during their pregnancy
²nonpregnant

4. Změny koncentrace cholesterolu v krevní plazmě u prasnic v průběhu březosti — Variations of cholesterol concentrations in the blood plasma of sows during their pregnancy
³nonpregnant

Koncentrace cholesterolu v krevní plazmě v průběhu březosti prasnic klesá. Je nejvyšší u zvířat nebřezích ($2,48 \pm 0,053 \text{ mmol.l}^{-1}$) a nejnižší u prasnic ve 101.—120. dnu březosti ($1,88 \pm 0,173 \text{ mmol.l}^{-1}$, $p < 0,001$). V období mezi 1.—40. a 81.—100. dnem osciluje koncentrace cholesterolu v krevní plazmě kolem $2,23 \pm 0,107$ (81.—100. den) až $2,31 \pm 0,084 \text{ mmol.l}^{-1}$ (1.—40. den březosti prasnic), ve 101.—120. dnu březosti klesá cholesterolémie prasnic na $1,88 \pm 0,173 \text{ mmol.l}^{-1}$. Diference cholesterolémie mezi zvířaty nebřezími a 81—100 a 101—120 dnů březími jsou statisticky průkazné ($p < 0,05$, popř. $p < 0,001$); průkazné jsou i difference této veličiny mezi zvířaty v 1.—40. a 101.—120. dnu březosti ($p < 0,05$) — obr. 4.

Koncentrace β -lipoproteinů a fosfolipidů klesá rovněž v krevní plazmě u březích prasnic. Zatímco u nebřezích zvířat činí β -lipoproteinémie $3,95 \pm 0,134 \text{ g.l}^{-1}$, je nejnižší u samic v 81.—100. dnu březosti ($3,47 \pm 0,199 \text{ g.l}^{-1}$; $p < 0,05$) — obr. 5.

Koncentrace fosfolipidů v krevní plazmě prudce klesá v prvních 60 dnech březosti, a to z $1,62 \pm 0,079 \text{ mmol.l}^{-1}$ u samic před inseminací na $1,29 \pm 0,05 \text{ mmol.l}^{-1}$ u zvířat ve 41.—60. dnu gravidity. Nicméně vzájemně difference hodnot tohoto parametru statistické significance nedosáhly a pohybují se na její hranici. Statistickou významnost dosahují difference koncentrace fosfolipidů mezi zvířaty nebřezími a v 81.—100. dnu březosti ($p < 0,05$). V údobí od 41.—60. dne březosti až do konce gravidity se koncentrace tohoto parametru v krevní plazmě téměř nemění (obr. 6).



5. Změny koncentrace β -lipoproteinů v krevní plazmě u prasnic v průběhu březosti — Variations of β -lipoprotein concentrations in the blood plasma of sows during their pregnancy
⁴nonpregnant

6. Změny koncentrace fosfolipidů v krevní plazmě u prasnic v průběhu březosti — Variations of phospholipid concentrations in the blood plasma of sows during their pregnancy
⁵nonpregnant

Koncentrace celkových lipidů, cholesterolu, β -lipoproteinů a fosfolipidů v krevní plazmě prasnic v průběhu březosti klesá. Takovou dynamiku cirkulujících lipidů prokazují u březích opic Martin aj. (1971), Zilver smit aj. (1972) a Acebal aj. (1973) prokazují u březích samic králíků pokles koncentrace cholesterolu v krevní plazmě během březosti i při podávání diety s vysokým obsahem cholesterolu. Trendu poklesu uvedených lipidových parametrů v krevní plazmě březích prasnic se vymykají změny stoupající koncentrace triglyceridů. Naše nálezy v tomto směru jsou v souladu s údaji o změnách této lipidové frakce v průběhu gravidity žen (Svanborg a Vikrot, 1965; Fabian aj., 1968; Knopp aj., 1973), opic (Martin aj., 1971) i krys (Robinson, 1967).

Vzestup koncentrace triglyceridů u gravidních samic uvádí Fabian aj. (1968) do souvislosti s poklesem aktivity lipoproteinlipázy tukové tkáně. Holm aj. (1989) referují o hormonální regulaci aktivity lipázy tukové tkáně jednak katecholaminy, působícími lipolyticky, jednak inzulinem, působícím antilipolyticky. Hamosh a Hamosh (1975) a Kim a Kalkhoff (1975) uvádějí rovněž, že pokles aktivity lipoproteinlipázy, prokázaný u krys ošetřených estrogeny, je provázen hypertriglyceridemií. Steingrimsdottir aj. (1980) prokazují pokles lipoproteinlipázové aktivity v prametrální tukové tkáni a současně vzestup koncentrace triglyceridů v krevní plazmě krys po třídní aplikaci estradiolu.

Brown aj. (1981) informují o řídícím vlivu estrogenů na LDL (low-density lipoprotein) receptory pro celulární výchyt cholesterolu. V poslední době přináší Fahraeus (1988) důkazy o tomto řídícím účinku estradiolu na koncentraci lipidů a lipoproteinů v krevní plazmě u žen.

V souvislosti s tím nelze opomenout skutečnost, že se koncentrace progesteronu v krevní plazmě u březích prasnic udržuje kolem 10 ng. ml^{-1} , zatímco se koncentrace estrogenů během březosti zvyšuje, takže dosahuje v posledních dnech březosti hladin nejvyšších, tj. $3\text{--}4 \text{ ng. ml}^{-1}$ (Ash aj., 1973). Je tedy pravděpodobné, že i u prasnic dochází v průběhu březosti ke zvyšování triglyceridémie a snižování celkové lipémie, cholesterolémie i lipoproteinémie složitou metabolickou cestou modulovanou především zvyšující se koncentrací estrogenů a vzájemnými měnícími se poměry obou samičích steroidů. Význam pohlavního dimorfismu je zahrnut mezi devět hlavních funkcí ovlivňujících koncentraci lipoproteinů v krevní plazmě lidí (Andersen, 1989).

Dynamika klesajících koncentrací všech sledovaných lipidových frakcí v krevní plazmě u březích prasnic, s výjimkou triglyceridů, navozuje mj. i otázku, jaká je míra závislosti vývoje fétů prasat, resp. fetálních membrán a placenty, na syntéze sterolů matkou. Experimenty, založené na myšlence zvýšit tukové rezervy u selat při narození obohacením diety matky tukem, nepřinesly přesvědčivé výsledky (Seerley aj., 1974; Boyd aj., 1978a, b; Boyd, 1979; Seerley aj., 1981). Dekapitací provedenou u fétů prasat ve 45. dnu bylo dosaženo zvýšení obsahu tělesného tuku a snížení popelovin ve 110. dnu gestace (Kasser aj., 1983). Je tedy pravděpodobné, že nízký obsah celkového tělesného tuku u selat při narození souvisí spíše s vlastními humorálními mechanismy fétů, které brzdí depozici tuku v těle, než s nedostatečným přívodem substrátu matkou. Tuto představu lze doplnit i poznatkem o prudkém zvětšení plazma-

tického objemu prasnice během březosti, které opakovaně prokazujeme i v těchto experimentech a které jsme zachytili již dříve (Ježková aj., 1977a, 1978). Takové zvětšení plazmatického objemu během březosti navozuje i absolutní zvětšení obsahu všech sledovaných komponent tukových parametrů v krevní plazmě a zvyšuje se tak absolutní množství celkových lipidů v oběhu matky 1,4krát, množství triglyceridů 2,1krát, β -lipoproteinů 1,4krát, cholesterolu 1,2krát a fosfolipidů 1,3krát.

V této souvislosti nabývá na významu nálezy, který uveřejnili Zilverman aj. (1972), o tom, že pokles koncentrace cholesterolu během březosti u samic králíků není výsledkem snížené produkce lipidů či lipoproteinů játry, popř. jinými orgány za lipemii odpovědnými.

Závěrem lze konstatovat, že v průběhu březosti prasnice klesá koncentrace celkových lipidů, cholesterolu, β -lipoproteinů a fosfolipidů, zatímco koncentrace triglyceridů v krevní plazmě stoupá. Současně zvětšení plazmatického objemu u březích samic na konci gravidity však znamená zvětšení absolutního množství jak celkových lipidů v krevní plazmě, tak cholesterolu, β -lipoproteinů, fosfolipidů i triglyceridů.

Literatura

- ACEBAL, C. — ARCHE, R. — CASTRO, J. — MUNICIO, A. M.: Effect of pregnancy and insulin administration on plasma lipid levels in the rabbit. *Ster. Lip. Res.*, 4, 1973, s. 310—322.
- AHLFELD, F.: Zur Frage über den Uebergang geformter Elemente von Mutter auf Kind. *Zbl. Gynäkol.*, 1, 1877, s. 265—267.
- ANDERSEN, G. E.: Influence of dietary fat intake during infancy upon serum lipids and lipoproteins. *Acta paed. scand.*, 351, 1989, s. 72—75.
- ASH, R. W. — CHALLIS, J. R. G. — HARRISON, F. A. — HEAP, R. B. — ILLINGWORTH, D. V. — PERRY, J. S. — POYSER, N. L.: Hormonal control of pregnancy and parturition; a comparative analysis. In: BARCROFT, J.: *Proc. Foetal and neonatal Physiology. Symposium 1972*, Cambridge, 1973, s. 551—561.
- BOYD, R. D.: Glucose homeostasis and fatty acid utilization in the neonatal pig. In: *Proc. Cornell Nutr. Conf. Syracuse, N. Y. 1979*, s. 102—107.
- BOYD, R. D. — MOSER, B. D. — PEO, E. R. — CUNNINGHAM, P. J.: Effect of energy source prior to parturition and during lactation in tissue lipid, liver glycogen and plasma levels of some metabolites in the newborn pig. *J. anim. Sci.*, 47, 1978a, s. 874—882.
- BOYD, R. D. — MOSER, B. D. — PEO, E. R. — CUNNINGHAM, P. J.: Effect of energy source prior to parturition and during lactation on piglet survival and growth and on milk lipids. *J. anim. Sci.*, 47, 1978b, s. 883—892.
- BROWN, M. S. — KOVANEN, P. T. — GOLDSTEIN, J. L.: Regulation of plasma cholesterol by lipoprotein receptors. *Science*, 212, 1981, s. 628—635.
- BURSTEIN, M. — SAMAILIE, J.: Dosage des β -lipoproteines seriques apres précipitation sélective par l'heparine. *La Presse Médicale*, 66, 1958, s. 974.
- FABIAN, E. — STORK, A. — KUCEROVÁ, L. — SPONAROVA, I.: Plasma levels of free fatty acids, lipoprotein lipase and fat heparin esterase in pregnancy. *Amer. J. Obstet. Gynec.*, 100, 1968, s. 904—907.
- FAHRAEUS, L.: The effects of estradiol on blood lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *Obstet. Gynec.*, 72, 1988, s. 180—220.
- FARNWORTH, E. R. — KRAMER, J. K. G.: Fat metabolism in growing swine: A review. *Can. J. anim. Sci.*, 67, 1987, s. 301—318.
- GOLDWATER, W. H. — STETTEN, DeW.: Studies in fetal metabolism. *J. biol. Chem.*, 169, 1947, s. 723—738.
- HAMOSH, M. — HAMOSH, R.: The effect of estrogen on the lipoprotein lipase activity of rat adipose tissue. *J. clin. Invest.*, 55, 1975, s. 1132—1135.
- HOLM, C. — BELFRAGE, P. — FREDRIKSON, G.: Human adipose tissue hormone-sensitive lipase: identification and comparison with other species. *Biochim. biophys. Acta*, 1006, 1989, s. 193—197.
- HULL, D.: The function and development of adipose tissue. In: DAVIS, J. A. — DOBBING, J. CH. (eds): *Scientific Foundations of Paediatrics*, London, 1974.

- HYTTEN, F. E. — LEITCHOVÁ, I.: Fyziologie těhotenství. Praha, 1969. 478 s.
- JEŽKOVÁ, D.: Chemická skladba těla selat v prvním měsíci po narození. Českoslov. Fyziol., 11, 1962, s. 271—272.
- JEŽKOVÁ, D.: Změny chemické skladby těla selat v prvních čtyřech týdnech života. Veter. Med. (Praha), 11, 1966, s. 497—505.
- JEŽKOVÁ, D.: Chemická skladba těla, rozměry gastrointestinálního traktu a hydratace selat držných na vysokokalorické semisyntetické dietě. [Habilitační práce.] Brno 1969. 134 s. — Vysoká škola veterinární.
- JEŽKOVÁ, D. — PADALÍKOVÁ, D.: Changes in the blood plasma content of nitrogenous components in pregnant sows and their fetuses. Acta veter. (Brno), 46, 1977a, s. 29—45.
- JEŽKOVÁ, D. — PADALÍKOVÁ, D.: Proteins and free amino acids in the blood plasma of sows before breeding, during gestation and after farrowing. Acta veter. (Brno), 46, 1977b, s. 217—230.
- JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. — KNOTKOVÁ, Z.: Změny glukozémie a laktacidémie u březích prasnic, fétů a u prasnic a selat v údobí do desátého dne po porodu. Veter. Med. (Praha), 35, 1990, s. 613—620.
- JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. — PADALÍKOVÁ, D.: Changes in the plasma volume, total blood volume and haematocrit values of pregnant sows. Acta veter. (Brno), 46, 1977a, s. 203—212.
- JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. — PADALÍKOVÁ, D.: Alpha-aminonitrogen in pregnant sows. Acta veter. (Brno), 46, 1977b, s. 213—216.
- JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. — PADALÍKOVÁ, D.: Změny plazmatického objemu a některých komponent krevní plazmy u březích prasnic. Českoslov. Fyziol., 27, 1978a, s. 258—259.
- JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. — PADALÍKOVÁ, D.: Změny hladiny ATP v krvi prasnic a jejich selat v průběhu porodu a narození. Českoslov. Fyziol., 27, 1978b, s. 258.
- KASSER, T. R. — HAUSMAN, G. J. — CAMPION, D. R. — MARTIN, R. J.: Lipogenesis and pancreatic insulin release in fetal pigs. J. anim. Sci., 56, 1983, s. 579—583.
- KIM, H. J. — KALKHOFF, R. K.: Sex steroid influence on triglyceride metabolism. J. clin. Invest., 56, 1975, s. 888—896.
- KNOPP, R. H. — WRATH, M. R. — CAROLL, C. J.: Lipid metabolism in pregnancy. I. Changes in lipoprotein triglyceride and cholesterol in normal pregnancy and the effects of diabetes mellitus. J. reprod. Med., 10, 1973, s. 95—101.
- LEAT, W. M. F.: Fatty acid composition of the plasma lipids of newborn and maternal ruminants. Biochem. J., 98, 1966, s. 598—603.
- MANNERS, M. J. — MCCREA, M. R.: Changes in the chemical composition of sow-reared piglets during the 1st month of life. Brit. J. Nutr., 17, 1963, s. 495—513.
- MARTIN, D. E. — WOLF, R. C. — MEYER, R. K.: Plasma lipid levels during pregnancy in the rhesus monkey, *Macaca mulata* 35957. Proc. Soc. exp. Biol. Med., 138, 1971, s. 638—641.
- MCCBRIDE, O. W. — KORN, E. D.: Uptake of free fatty acids and chylomicron glycerides by guinea pig mammary gland in pregnancy and lactation. J. Lipid Res., 5, 1964, s. 453—458.
- PÉGORIER, J. P. — DUÉE, P. H. — GIRARD, J. R. — PERET, J.: Development of gluconeogenesis in isolated hepatocytes from fasting or suckling newborn pigs. J. Nutr., 112, 1982, s. 1038—1046.
- POPJAK, G. — BEECKMANS, M.: Synthesis of cholesterol and fatty acids in fetuses and in mammary glands of pregnant rabbits. Biochem. J., 46, 1950, s. 547—561.
- RICHTERICH, R.: Clinical Chemistry. Theory and Practice. Basel—New York, 1969. 542 s.
- ROBINSON, D. S.: The role of the clearing factor lipase in the removal of chylomicron triglycerides from the blood. In: Deuel conference of lipids on the fate of dietary lipids, 1967, s. 166.
- SEERLEY, R. W. — PACE, T. A. — FOLEY, C. W. — SCARTH, R. D.: Effect of energy intake prior to parturition on milk lipids and survival rate, thermostability and carcass composition of piglets. J. anim. Sci., 38, 1974, s. 64—70.
- SEERLEY, R. W. — SNYDER, R. A. — MCCAMPBELL, H. C.: The influence of sow dietary lipids and choline on piglet survival, mild and carcass composition. J. anim. Sci., 52, 1981, s. 542—550.
- SEIDEL, H. — FÜRL, M. — FÜRL, B.: Die glukoneogenetische Kapazität von Saugferkeln und Läuferchweinen. Arch. exp. Veter.-Med., 30, 1976, s. 481—490.
- SPRAY, CH. M. — WIDDOWSON, E. M.: The effect of growth and development on the composition of mammals. Brit. J. Nutr., 4, 1950, s. 332—353.

STEINGRIMSDOTTIR, L. — BRASEL, J. — GREENWOOD, M. R. C.: Hormonal modulation of adipose tissue lipoprotein lipase may alter food intake in rats. *Amer. J. Physiol.*, 239, [Endocrinol. Metab.], 1980, E162—E167.

SVANBORG, A. — VIKROT, O.: Plasma lipid fractions, including individual phospholipids at various stages of pregnancy. *Acta med. scand.*, 178, 1965, s. 615.

ZILVERSMIT, D. B. — HUGHES, L. B. — REMINGTON, M.: Hypolipidemic effect of pregnancy in the rabbit. *J. Lipid Res.*, 13, 1972, s. 750—756.

Došlo dne 5. 11. 1990

JEŽKOVÁ, D. — SMRČKOVÁ, M. (University of Veterinary Medicine, Brno): *Variations of lipid concentrations in the blood plasma of pregnant sows*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (10): 599—606.

Variations of plasma volume (PV) and variations of triglyceride, cholesterol, total lipid, β -lipoprotein and phospholipid concentrations in the blood plasma were investigated in trials with ten sows, crossbreds of the White Thoroughbred and Landrace breeds, at the age of 2—3 years, kept on a defined diet; the trials were performed before the sows became pregnant and during their pregnancy (days 1—40, 41—60, 61—80, 81—100 and 101—120). The PV in nonpregnant sows is 9.8 ± 0.33 l. Following a decrease to the values of 7.8 ± 0.33 l ($p < 0.01$) in the first 40 days of pregnancy the plasma volume increases in the successive periods and it makes 15.4 ± 0.19 l at the end of pregnancy ($p < 0.001$). Total lipaemia decreases during pregnancy from 2.80 ± 0.054 in nonpregnant sows to 2.49 ± 0.245 g per l in sows at the end of pregnancy. Cholesterol concentrations in the blood plasma also decrease from 2.48 ± 0.53 in nonpregnant ones to 1.88 ± 0.173 mmol per l ($p < 0.001$) in sows at the end of pregnancy, β -lipoprotein concentrations from 3.95 ± 1.134 in nonpregnant ones to 3.47 ± 0.199 g per l in sows on days of pregnancy 81—100 ($p < 0.05$), phospholipid concentrations in the first 60 days of pregnancy from 1.62 ± 0.079 before insemination to 1.29 ± 0.05 mmol per l in sows of 41—60 day pregnancy. Triglyceride concentrations in the blood plasma increase during the pregnancy period from 0.42 ± 0.016 mmol per l in nonpregnant sows to 0.57 ± 0.098 mmol per l in highly pregnant sows ($p < 0.02$). But in the first 40 days of pregnancy triglyceride concentrations decrease to 0.39 ± 0.036 mmol per l, in the following period of pregnancy they increase and reach the highest concentrations in sows on days of pregnancy 101—120. Increases in the absolute amounts of total lipids on the one hand, and of cholesterol, β -lipoproteins and phospholipids at a rate of 1.2—1.4 times and in those of triglycerides at a rate of 2.1 times on the other hand are related to the increase in PV of sows at the end of pregnancy. The variations of fatty components in the blood plasma of sows during their pregnancy are compared with findings concerning these variations in the blood plasma during the pregnancy of females of other animal species.

sow; pregnancy; blood plasma; lipids

Adresa autorek:

Prof. MVDr. Dagmar Ježková, DrSc., RNDr. Marie Smrčková, Vysoká škola veterinární, Palackého 1—3, 612 42 Brno

BIOMETRICKÉ PARAMETRE MATERNICE A VAJEČNÍKOV PO APLIKÁCIÍ DEPOTOCINU INJ. SPOFA V RANOM PUERPÉRIU OVIEC

M. Krajničáková, J. Elečko, E. Bekeová, I. Maraček, V. Hendrichovský

KRAJNIČÁKOVÁ, M. — ELEČKO, J. — BEKEOVÁ, E. — MARAČEK, I. — HENDRICHOVSKÝ, V. [Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Košice]: *Biometrické parametre maternice a vaječníkov po aplikácii Depotocinu inj. Spofa v ranom puerpériu oviec*. Veter. Med. [Praha], 36, 1991 [10]: 607—618.

V práci sme sa zamerali na sledovanie vybraných biometrických parametrov maternice a vaječníkov oviec v puerperálnom období a po podaní carbetocínu (Depotocin inj. Spofa). Zvieratá sme rozdelili do dvoch skupín po 15 bahníc. Ovce prvej skupiny sme ošetrili druhý a štvrtý deň po vybahnení dávkou $2 \times 0,07$ mg carbetocínu. Druhá skupina ($n = 15$) slúžila ako kontrola. Bahnice sme vykrvili v 1., 7., 17., 25. a 34. deň po pôrode. Pri porovnávaní hmotnosti tela i rohov maternice sme zaznamenali klesajúcu tendenciu so štatisticky preukazným znížením v 17. a 34. dni u skupiny oviec bez ošetrovania. Po ošetrení carbetocínom sme zistili signifikantne nižšiu hmotnosť tela maternice už v 7. dni po pôrode. V tom istom dni sa znížila i hmotnosť gravidných rohov. Redukcia dĺžky tela maternice bola signifikantná medzi 17. a 34. dňom po pôrode u obidvoch skupín. Hmotnosť vaječníkov mala vzostupnú tendenciu do 17. dňa s jeho prechodným znížením v 25. dni sledovaného obdobia v skupine oviec po ošetrení carbetocínom. Ich hmotnosť bola nepreukázne vyššia oproti hmotnosti vaječníkov u neošetrených bahníc. Počet drobných folikulárnych štruktúr ovárií sa s predĺžovaním puerpéria znižoval u obidvoch skupín. Vyšší počet povrchových folikulov v 25. a 34. dni po pôrode sme zistili u skupiny ošetrenej carbetocínom. Z dosiahnutých výsledkov vyplýva, že aplikácia carbetocínu v ranom puerpériu má pozitívny vplyv na urýchlenie involučných procesov maternice a stimuluje folikulo-genézu vaječníkov.

puerpérium; bahnice; hmotnosť; maternica; vaječník

V súvislosti so zvyšovaním frekvencie bahnenia hlavne v špecializovaných chovoch s vlnovo-mäsovou produkciou je aktuálnou otázkou objektivizácia fyziologického priebehu puerpéria, prípadne skrátenia involučného intervalu maternice exogénnym ošetrením uterotonikami. Signifikantné skrátenie involučného a restitučného intervalu maternice kráv pri dennej aplikácii 50 mg progesterónu podaného medzi 12.—23. dňom po pôrode uvádza Foote a Hunter (1964). Naproti tomu ošetrenie bahníc progesterónom počas skorého postpartálneho obdobia môže spôsobiť retardáciu involučného procesu maternice [Foote a Call, 1969]. Aplikácia 17 beta-estradiolu kravám v ranom postpartálnom období neprejavila ovplyvnenie involúcie maternice [Marion a Gier, 1968]. Ošetrenie syntetickým oxytocínom v prvých dňoch po pôrode

kráv vyvoláva zvýšenie motility maternice s prioritným účinkom na priebeh involúcie (Kudláč a i., 1982). Involučné procesy maternice sú sprevádzané rozsiahlymi regresívnymi zmenami, ktoré sa prejavujú v skrátení dĺžky, znížení hmotnosti a objemu maternice po pôrode. Ukončenie involučných procesov maternice je dôležitým momentom pre obnovenie ovariálnej aktivity puerperálneho obdobia.

Obdobie po pôrode sa manifestuje i zmenami v hmotnosti vaječníkov. Zmenšenie hmotnosti vaječníkov o 26 % zaznamenal Burov (1982) na 7. deň po vybahnení. Aplikácia 125 μ g cloprostenolu v prípravku Oestrophon inj. Spofa sa prejaví zvýšením hmotnosti vaječníkov (Maraček a i., 1985) v čase jesenného obdobia.

Na začiatku popôrodného obdobia dochádza k určitej stagnácii folikulov, ktorá je pravdepodobne spôsobená atréziou (Schirar a Martinet, 1982; Doufor a Roy, 1983).

Našu prácu sme zamerali na stanovenie hmotnosti s dĺžky tela i rohov maternice ako aj hmotnosti, dĺžky, šírky a výšky vaječníkov po podaní carbetocínu (Depotocin inj. Spofa) v puerperálnom období oviec plemena slovenské merino. Cieľom práce bolo získať objektívne biometrické údaje o maternici i vaječníkoch a zaznamenať vplyv carbetocínu na involučné procesy maternice a vaječníkov oviec.

MATERIÁL A METÓDY

Do sledovania sme zaradili 30 bahnič plemena slovenské merino vo veku 3—5 rokov. Zvieratá v priebehu pokusov boli držané v podmienkach úžitkového chovu. Kŕmené boli senom s prídavkom jadrového krmiva, voda a soľ boli podávané *ad libitum*. Zvieratá sme rozdelili po 15 bahníc do dvoch skupín. Bahnice pokusnej skupiny ($n = 15$) sme ošetrili carbetocínom (Depotocin inj. Spofa) v dávke $2 \times 0,07$ mg. Prvú dávku sme aplikovali v druhý deň po pôrode intramuskulárne (*i. m.*) a štvrtý deň po vybahnení sme injikovali subkutánne (*s. c.*) druhú dávku. Druhá skupina ($n = 15$) slúžila ako kontrola. Zvieratá z oboch skupín sa zabili po tri ($n = 3$) v 1., 7., 17., 25. a 34. deň po pôrode. Hneď po vykrvení sa exidoval pohlavný aparát, u ktorého sme merali dĺžku a vážili hmotnosť tela i rohov maternice. Počas zaznamenávania údajov sme rohy maternice rozlíšili na gravidné a negravidné. Telo maternice sme merali od odstupe rohov po úroveň vnútornej bránky (*orificium internum*). Vaječníky sme vážili na analytických váhach a zisťovali ich dĺžku, šírku a výšku. Na povrchu vaječníkov sme určovali počet a veľkosť folikulov. Získané hodnoty sme štatisticky hodnotili Studentovým *t*-testom (Červenka, 1975).

VÝSLEDKY

Hmotnosť tela maternice (obr. 1, tab. I) u oviec kontrolnej skupiny mala počas sledovaného obdobia klesajúcu tendenciu so štatisticky preukazným znížením od 17. do 34. dňa po pôrode ($P < 0,01$). V pokusnej skupine sme zistili výrazné štatisticky významné zníženie hmotnosti už v 7. dni po vybahnení na hodnotu $185,66 \pm 38,91$ g ($P < 0,05$). V ďalšom období sledovania pokles hmotnosti tela maternice bol miernejší ako u kontrolnej skupiny. Konečná priemerná hodnota tela maternice na 34. deň po pôrode bola u ošetrovaných oviec vyššia v porovnaní s kontrolou. Štatisticky preukázne rozdiely v hmotnosti tela maternice medzi sledovanými skupinami sme zistili v 34. deň sledovaného obdobia ($P < 0,05$).

Prí hodnotení hmotnosti gravidných rohov maternice v kontrolnej skupine sme zaznamenali štatisticky významné zníženie hmotnosti v 25. a 34. dni a ich hmotnosť sa pohybovala od $15,2 \pm 5,4$ do $3,5 \pm 0,7$ g ($P < 0,05$, $P < 0,01$). Hmotnosť gravidných rohov maternice bahníc pokusnej

I. Hmotnosť [g] tela a rohov maternice kontrolnej a pokusnej skupiny oviec v popôrodnom období — The weight [g] of the body and horns of uterus in control and experimental groups of ewes in the puerperal period

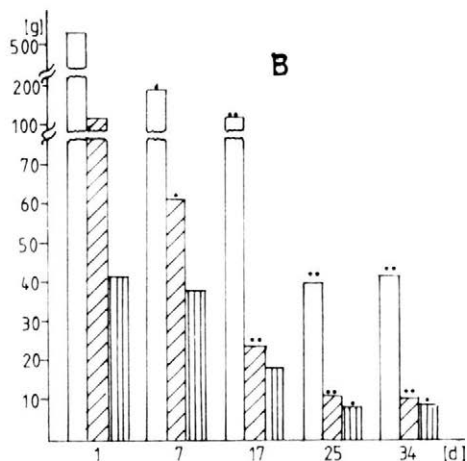
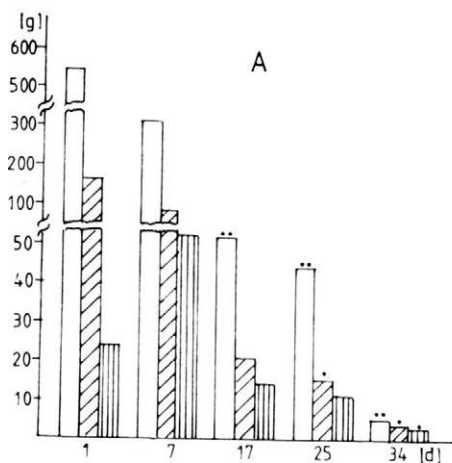
Dni ¹	Počet zvierat ²	Kontrolná skupina ³			Pokusná skupina ⁴		
		telo maternice ⁵	gravidný roh maternice ⁶	negravidný roh maternice ⁷	telo maternice ⁵	gravidný roh maternice ⁶	negravidný roh maternice ⁷
1	3	545,0±122,5	164,7±69,8	23,8± 6,83	519,33±92,55	110,46±18,93	40,10± 9,65
7	3	305,3± 51,6	82,3±29,0	52,1±19,50	185,66±28,91	60,89± 9,45	37,60± 9,18
17	3	56,0± 14,6	20,4±10,4	14,1±10,70	106,56±41,08	23,23±13,81	17,83±10,41
25	3	44,1± 3,8	15,2± 5,4	11,2± 3,70	39,03± 9,90	10,13± 0,41	7,51± 0,82
34	3	5,2± 0,3	3,5± 0,7	3,1± 0,80	41,36± 8,52	9,86± 3,49	8,38± 3,74

¹days, ²number of animals, ³control group, ⁴experimental group, ⁵body of uterus, ⁶gravid horn of uterus, ⁷nongravid horn of uterus

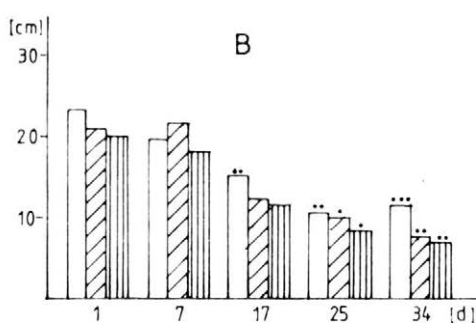
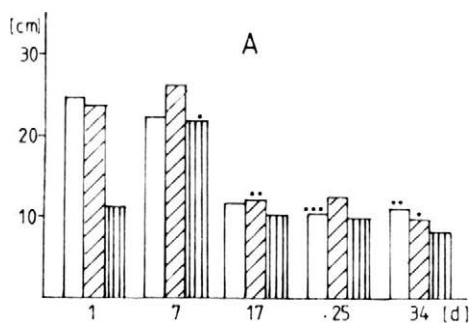
II. Dĺžka [cm] tela a rohov maternice kontrolnej a pokusnej skupiny oviec v popôrodnom období — The length [cm] of the body and horns of uterus in control and experimental groups of ewes in the puerperal period

Dni ¹	Počet zvierat ²	Kontrolná skupina ³			Pokusná skupina ⁴		
		telo maternice ⁵	gravidný roh maternice ⁶	negravidný roh maternice ⁷	telo maternice ⁵	gravidný roh maternice ⁶	negravidný roh maternice ⁷
1	3	24,7±1,90	23,70±5,50	11,10±0,70	23,30±1,22	21,16±2,51	20,10±3,24
7	3	22,3±2,30	26,30±4,80	21,80±3,00	19,66±2,64	21,73±2,04	18,83±3,30
17	3	11,7±0,70	12,00±2,40	10,30±2,70	15,30±1,32	12,56±3,81	11,50±3,72
25	3	10,4±0,30	12,50±3,70	9,90±2,00	10,96±2,19	10,03±2,74	8,73±2,65
34	3	11,2±1,10	9,70±1,60	8,30±2,20	11,66±0,37	7,76±0,81	7,30±0,70

For 1—7 see Tab. I



1. Hmotnosť tela a rohov maternice kontrolnej a pokusnej skupiny v puerperálnom období — The weight of the body and horns of uterus in control and experimental groups in the puerperal period



2. Dĺžka tela a rohov maternice kontrolnej a pokusnej skupiny v puerperálnom období — The length of the body and horns of uterus in control and experimental groups in the puerperal period

Vysvětlivky k obr. 1 a 2 — Explanatory notes to Figs. 1 and 2;

- A — kontrolná skupina — control group
 B — pokusná skupina — experimental group
 □ — telo maternice — body of uterus
 /// — gravidný roh — gravid horn
 ||| — negravidný roh — nongravid horn

skupiny v 1. dni po pôrode sa pohybovala v priemere $110,46 \pm 18,9$ g. Jej pokles sa signifikantne znížil už v 7. dni po pôrode na priemernú hodnotu $60,89 \pm 9,45$ g. Znižovanie hmotnosti gravidných rohov pokračovalo do 34. dňa po pôrode a pohybovala sa na hodnotách $9,86 \pm 3,49$ g. Aj keď zaznamenaná hmotnosť gravidných rohov bola vyššia v pokusnej oproti kontrolnej skupine v 34. deň popôrodného obdobia, ich rozdiely neboli štatisticky významné ($P > 0,05$).

Pri sledovaní zmien hmotnosti negravidných rohov (obr. 1, tab. I) v kontrolnej skupine sme po prechodnom zvýšení 7. deň po pôrode zaznamenali klesajúcu tendenciu so štatisticky významným rozdielom na 34. deň v porovnaní k 1. dňu po vybahnení. V pokusnej skupine sme zistili štatisticky významné zníženie hmotnosti negravidných rohov maternice bahnic v 25. a 34. dni po pôrode ($P < 0,05$).

Pri sledovaní dĺžky tela maternice bahnic kontrolnej skupiny (obr. 2, tab II) sme zaznamenali signifikantné skrátenie jej dĺžky medzi 17. a 34. dňom sledovania ($P < 0,01$, $P < 0,001$). Pokles dĺžky tela maternice v pokusnej skupine sme zistili do 25. dňa sledovania v priemere od $23,30 \pm 1,22$ do $10,96 \pm 21,9$ cm. Dĺžka tela maternice bola vyššia, nie však štatisticky preukazne, v 34. dni oproti kontrolnej skupine.

Po štatisticky nepreukaznom predĺžení gravidného rohu maternice oviec kontrolnej skupiny v 7. dni po vybahnení sa jeho dĺžka signifikantne skrátila až v 34. dni sledovania na priemernú hodnotu $9,7 \pm 1,6$ cm ($P < 0,05$). Pri hodnotení dĺžky gravidného rohu maternice oviec pokusnej skupiny sme zaznamenali signifikantné zmenšenie jeho dĺžky v 25. a 34. dni v porovnaní k 1. dňu po pôrode ($P < 0,05$; $P < 0,01$).

Vzostup dĺžky negravidného rohu maternice oviec kontrolnej skupiny na 7. deň po vybahnení bol vystriedaný podobne ako v jeho hmotnosti pozvoľným poklesom až do 34. dňa sledovania. Priemerná dĺžka negravidných rohov v 25. a 34. dni po pôrode u pokusnej skupiny sa pohybovala od $7,30 \pm 0,70$ do $8,37 \pm 2,65$ cm a bola štatisticky významne nižšia v porovnaní k 1. dňu po vybahnení ($P < 0,05$; $P < 0,01$). Výsledky zmien dĺžky tela a rohov maternice kontrolnej a pokusnej skupiny boli štatisticky nepreukazné.

Dĺžka vaječníkov (tab. III) pri gravidnom rohu v kontrolnej skupine bola nesignifikantne väčšia ako dĺžka kontralaterálneho vaječníka. Väčšiu avšak štatisticky nepreukaznú dĺžku ipsilaterálneho vaječníka sme zistili v pokusnej skupine (tab. IV).

III. Dĺžka, šírka a výška [cm] vaječníkov kontrolnej skupiny oviec v popôrnom období — The length, width and height (cm) of ovaries of the control group in the puerperal period

Dni ¹	Ipsilaterálne vaječníky ²			Kontralaterálne vaječníky ³		
	dĺžka ⁴	šírka ⁵	výška ⁶	dĺžka ⁴	šírka ⁵	výška ⁶
1	$1,685 \pm 0,20$	$0,698 \pm 0,02$	$1,002 \pm 0,07$	$1,545 \pm 0,36$	$0,484 \pm 0,11$	$0,945 \pm 0,18$
7	$2,068 \pm 0,28$	$0,559 \pm 0,06$	$1,419 \pm 0,39$	$1,594 \pm 0,05$	$1,700 \pm 0,38$	$1,256 \pm 0,41$
17	$1,566 \pm 0,30$	$0,952 \pm 0,16$	$1,414 \pm 0,46$	$1,290 \pm 0,49$	$0,825 \pm 0,08$	$1,382 \pm 0,30$
25	$1,786 \pm 0,27$	$0,960 \pm 0,19$	$0,964 \pm 0,46$	$1,641 \pm 0,26$	$0,929 \pm 0,27$	$1,044 \pm 0,13$
34	$1,716 \pm 0,58$	$0,988 \pm 0,21$	$1,203 \pm 0,26$	$1,586 \pm 0,62$	$1,340 \pm 0,70$	$1,090 \pm 0,22$

¹days, ²ipsilateral ovaries, ³contralateral ovaries, ⁴length, ⁵width, ⁶height

IV. Dĺžka, šírka a výška (cm) vaječníkov pokusnej skupiny oviec v popôrodnom období — The length, width and height (cm) of ovaries of the experimental group of ewes in the puerperal period

Dni ¹	Kontralaterálne vaječníky ³			Ipsilaterálne vaječníky ²		
	dĺžka ⁴	šírka ⁵	výška ⁶	dĺžka ⁴	šírka ⁵	výška ⁶
1	1,673±0,195	0,676±0,058	1,054±0,041	1,538±0,318	0,507±0,049	0,895±0,067
7	2,158±0,360	1,154±0,329	1,325±0,230	1,768±0,217	0,749±0,050	1,426±0,244
17	1,839±0,092	1,082±0,322	1,194±0,157	1,514±0,271	0,800±0,070	1,229±0,181
25	1,992±0,213	0,906±0,091	1,364±0,213	1,820±0,286	0,786±0,075	1,275±0,201
34	1,923±0,858	0,974±0,043	1,533±0,358	1,645±0,094	0,927±0,092	1,371±0,060

For 1—6 see Tab. III

V. Hmotnosť (g) vaječníkov kontrolnej a pokusnej skupiny oviec v puerperálnom období — The weight (g) of ovaries in control and experimental groups of ewes in the puerperal period

Počet zvierat ¹	Dni ²	Kontrolná skupina ³		Pokusná skupina ⁴	
		hmotnosť vaječníkov ⁵		hmotnosť vaječníkov ⁵	
		ipsilaterálne ⁶	kontra-laterálne ⁷	ipsilaterálne ⁶	kontra-laterálne ⁷
3	1	0,933±0,20	0,683±0,23	1,066±0,251	0,720±0,180
3	7	0,953±0,13	0,666±0,15	1,366±0,230	0,950±0,299
3	17	1,000±0,51	0,983±0,32	1,600±0,427	1,200±0,458
3	25	1,000±0,26	0,890±0,20	1,185±0,477	0,983±0,529
3	34	0,996±0,10	0,910±0,17	1,350±0,173	1,266±0,144

¹number of animals, ²days, ³control group, ⁴experimental group, ⁵weight of ovaries, ⁶ipsilateral, ⁷contralateral

Rozdiely vo výške ipsi- a kontralaterálnych vaječníkov medzi sledovanými skupinami sme nezistili. Pri hodnotení šírky kontralaterálnych vaječníkov sme zaznamenali štatisticky významné rozdiely v 34. dni sledovania medzi kontrolnou a pokusnou skupinou.

Pri hodnotení hmotnosti vaječníkov (tab. V) sme zistili v pokusnej skupine vyššiu, avšak štatisticky nepreukaznú hmotnosť ipsilaterálnych vaječníkov oproti kontrolnej skupine medzi sledovanými dňami popôrodného obdobia.

Prítomnosť folikulov rozdelených do jednotlivých kategórií obidvoch skupín sme zhrnuli v tab. VI. Najväčší počet drobných štruktúr 28 sme zistili na ipsilaterálnom vaječníku kontrolnej skupiny. Ich počet sa s predlžovaním puerpéria znižoval v prospech folikulov väčších ako 2,4 a 5 milimetrov. V pokusnej skupine počet drobných štruktúr klesal počas sledovaného obdobia na ipsilaterálnom vaječníku v prospech veľkosti a počtu folikulov väčších ako 3 a 5 mm v 25. dni a počtu väčších ako 8,9 a 18 mm v 34. deň po pôrode.

VI. Počet folikulov na vaječníkoch kontrolnej a pokusnej skupiny po pôrode oviec — The number of follicles in the ovaries of control and experimental groups after parturition of ewes

Počet zvierat ¹	Dni ²	Kontrolná skupina ³								Pokusná skupina ⁴										
		vaječníky ⁵								vaječníky ⁵										
		ipsilaterálne ⁶				kontralaterálne ⁷				ipsilaterálne ⁶				kontralaterálne ⁷						
		počet folikulov ⁸								počet folikulov ⁸										
		2	4	5	DŠ	2	4	5	DŠ	3	5	7	8	9	1,8	DŠ	2	4	5	DŠ
3	1	—	—	—	14	—	—	—	16	—	—	—	—	—	17	—	—	—	16	
3	7	—	—	—	28	—	—	—	23	—	—	—	—	—	29	—	—	—	23	
3	17	4	3	—	20	3	2	3	24	1	2	—	—	1	—	20	3	2	3	24
3	25	3	—	1	16	—	2	1	14	5	3	—	—	—	—	19	—	2	1	14
3	34	11	3	—	19	2	2	2	33	1	4	1	1	2	1	16	2	2	2	33

For 1—4 and 6—7 see Tab. V; ⁵ovaries, ⁸number of follicles

Popôrodné obdobie sa líši u jednotlivých druhov zvierat dĺžkou doby trvania, rozsahom a rýchlosťou involučných zmien na pohlavnom aparáte. Pokles hmotnosti tela i gravidných rohov maternice nami sledovaných oviec kontrolnej skupiny popôrodného obdobia je v súlade s nálezmi, ktoré zaznamenali u oviec Van Niekerk (1979), Ainsworth a i. (1982), Burov (1982), Crowder a i. (1982). Nami zistená klesajúca tendencia hmotnosti tela a rohov maternice uvedenej skupiny je v súlade s nálezmi Palmera a i. (1965), ktorí zaznamenali pokles hmotnosti maternice prasníc od 1. do 28. dňa po pôrode ($272,4 \pm 139,3$ až $244,0 \pm 0,09$ g). Štatisticky preukazný nižší rozdiel hmotnosti tela i gravidných rohov maternice sme zistili od 17. do 34. dňa v porovnaní k prvému dňu po pôrode. K podobným výsledkom dospel Burov (1982), ktorý poukazuje na signifikantné zníženie hmotnosti tela i rohov maternice oviec už v 14. dni v porovnaní k prvému dňu po pôrode.

Prezentované výsledky pokusnej skupiny, pri ktorých sme zistili signifikantné zníženie hmotnosti tela a gravidných rohov maternice v 7. deň po vybahnení poukazujú, že aplikácia dvojitej dávky carbetocínu v krátkych intervaloch po pôrode výrazne ovplyvnila pokles hmotnosti maternice v uvedenom dni. Nami zistené údaje celkovej hmotnosti maternice v pokusnej skupine sú porovnateľné s výsledkami hmotnosti maternice oviec, ktoré udáva Crowder a i. (1982) u skupiny oviec ošetrovaných s GnRH ku koncu gravidity a krátko po pôrode. Výsledky zvýšenia hmotnosti maternice oviec v pripúšťacom období po podaní PMSG uvádzajú Whyman a Moore (1980).

Pri porovnávaní hmotnosti tela a rohov maternice nami sledovaných bahníc sme v skupine po ošetrovaní carbetocínom zaznamenali ich signifikantne nižšiu hmotnosť už v 7. dni po vybahnení v porovnaní s kontrolnou neošetrovanou skupinou, pri ktorej bola zistená štatisticky preukazne klesajúca tendencia ich hmotnosti od 17. do 34. dňa po pôrode. Vzostupná tendencia hmotnosti tela a gravidných rohov maternice oviec v 34. dni po pôrode v skupine oviec po ošetrovaní je podobná folikulárnej fáze pohlavného cyklu, v ktorej dochádza simultanne k zvýšeniu permeability kapilár, celkovému vzostupu hmotnosti uteru v dôsledku produkcie vyšších koncentrácií 17 beta-estradiolu folikulárnymi štruktúrami vaječníka.

Dĺžka tela a rohov maternice oviec pokusnej skupiny nami sledovaných bahníc je porovnateľná s literárnymi údajmi autorov Van Wyk a i., (1972), ktorí uvádzajú ich maximálnu redukciu na 20. deň po vybahnení. Hodnoty dĺžky tela a rohov maternice 34. deň po pôrode u kontrolnej skupiny sú porovnateľné s výsledkami, ktoré uvádza Hafez (1974).

Všeobecne udávaná hmotnosť vaječníka oviec v rozpätí 3000—4000 mg sa zvyšuje aplikáciou hormonálnych prípravkov (Hafez, 1974; McDonald, 1980 a iní). Zistenia zvýšenej hmotnosti vaječníkov oviec v pripúšťacom období po podaní PMSG, PGF₂ alfa sú v priamej závislosti priemernej hmotnosti vaječníkov jednotlivých skupín od celkovej folikulárnej rezponzie na príslušné ošetrovanie u tých istých zvierat (Whyman a Moore, 1980). Údaje prechodného zvýšenia hmotnosti vaječníkov podaním cloprostenu v luteálnej fáze cyklu oviec plemena cigája

M a r a č e k a i. (1985). Vyššiu, nie však štatisticky významnú dĺžku, šírku žltým telieskom (N i s w e n d e r, 1981).

Pozorovaný štatisticky nepreukazný výskyt zvýšenej hmotnosti ipsilaterálnych vaječníkov pokusnej skupiny medzi jednotlivými dňami sledovaných bahníc je porovnateľný s údajmi o prechodnom zvýšení hmotnosti vaječníkov 24 h po podaní cloprostenu (M a r a č e k a i., 1985). Zníženie hmotnosti vaječníkov pri negravidnom rohu v 7. deň po vybahnení v kontrolnej skupine pri našich sledovaniach možno porovnať s údajmi, ktoré uvádza B u r o v (1982); referuje o zníženej hmotnosti ovárií 7. deň po pôrode.

Výsledky našich pozorovaní v dĺžke, šírke a výške u pokusnej skupiny neboli štatisticky preukázne a sú porovnateľné s údajmi, ktoré publikoval M a r a č e k a i. (1985). Vyššiu, nie však štatisticky významnú dĺžku, šírku sme zistili v pokusnej skupine. Naše výsledky podporujú údaje T o k o š a a i. (1990) o hodnotení dĺžky vaječníkov oviec v pripúšťacom období po injikovaní hormonálneho prípravku.

Na začiatku popôrodného obdobia dochádza k určitej stagnácii folikulov, ktorá je pravdepodobne spôsobená atreziou (S c i r a r a M a r t i n e t, 1982; D o u f o u r a R o y, 1983). Pri nami diferencovaných folikuloch do jednotlivých kategórií obidvoch skupín sme v 1. a 7. dni sledovania zaznamenali určitú stagnáciu. O podobných zisteniach referuje Z r a l ý a i. (1989) po pôrode kráv a K u d l á č a G r o h (1977) po pôrode prasníc. Zdá sa, že v tomto období prebieha prvá vlna postpartálnej ovariálnej aktivity. S poklesom drobných štruktúr na ipsilaterálnom vaječníku pokusnej skupiny sme do 34. dňa po pôrode zaznamenali rôzny počet folikulov väčších ako 7, 8, 9 a 18 mm. Naproti tomu na kontralaterálnom vaječníku uvedenej skupiny a sledovanom dni sme zistili štyri folikuly väčšie ako 8 mm. Zvýšenie počtu folikulov väčších ako 3 mm pozorovali T u r n b u l l a i. (1977) a D o t t a i. (1979) 48 h po aplikácii PMSG 1000 m. j., pričom boli folikuly v rôznych skupinách vývoja v tomto období. Väčší počet rastúcich terciárnych folikulov sme zistili na povrchu vaječníka 34. deň po pôrode v pokusnej skupine, na ktorý mal pozitívny vplyv podaný carbetocín.

V sledovanom časovom intervale sme nezistili čerstvo ovulovaný folikul ani CL. Faktory, ktoré vplyvajú na vývoj rekrutácie a selekcie terciárnych folikulov zatiaľ nie sú dostatočne objasnené. Domnievame sa, že pri neuskutočnenej ovulácii intraovariálne peptidy mohli zohrať dôležitú úlohu v regulácii lokálnej modulácie vývoja folikulu alebo uplatnením ďalších faktorov pri selekcii dominantného folikulu (P r e s l a B u k o v s k ý, 1989).

Získané výsledky prispievajú k rozšíreniu poznatkov o involučných procesoch maternice po aplikácii carbetocínu (Depotocin inj. Spofa) a jeho vplyv na zmeny počtu i veľkosť folikulov vaječníkov v puerperálnom období.

Literatúra

- AINSWORTH, L. — LACHANCE, R. — LABRIE, F.: Effect of GnRH induced endogenous luteinizing hormone release and endogenous progestagen treatment on ovarian activity in the post partum ewe. J. anim. Sci., 54, 1982, s. 998—1004.
BUROV, V. G.: Involucija polovych organov u ovce. Veterinarija, 2, 1982, s. 57—58.

- CROWDER, M. E. — GILLES, P. A. — TAMANINI, C. — MOSS, G. E. — NETT, M.: Pituitary content of gonadotropins and GnRH-receptors in pregnant, post partum and steroid-treated oos ewes. *J. anim. Sci.*, 54, 1982, s. 1235—1242.
- ČERVENKA, J.: Základy štatistiky. Martin, Osveta 1975, s. 67—124.
- DOTT, H. M. — HAY, M. E. — CRAN, D. G. — MOOR, R. M.: Effect of exogenous gonadotropin (PMSG) on the control follicle population in the sheep. *J. Reprod. Fertil.*, 56, 1979, s. 683—689.
- DOUFOUR, J. J. — ROY, G. L.: Distribution of ovarian follicular populations during early post-partum in the dairy cow. *J. anim. Sci., Suppl.*, 1983, s. 331—336.
- FOOTE, W. D. — HUNTER, J. E.: Postpartum intervals of beef cows treated with progesterone and estrogen. *J. anim. Sci.*, 33, 1964, s. 517—520.
- FOOTE, W. C. — CALL, J. W.: Postpartum changes in the uterus and blood of ewes during the anestrous season. *J. anim. Sci.*, 29, 1969, s. 190.
- HAFEZ, S. E. S.: Reproduction in farm animals. Philadelphia, Lea and Febiger, 1974.
- KUDLÁČ, E. — GROH, L.: Morphologische Veränderungen am Ovarian und Uterus bei Sauen im Puerperium. *Zuchthygiene*, 14, 1977, s. 64—72.
- KUDLÁČ, E. — VINKLER, R. — VRTĚL, M. — VLČEK, L.: Poznatky o možnostech ovlivňování některých pohlavních funkcí skotu. *Veterinářství*, 32, 1982, s. 484—487.
- MARAČEK, I. — HENDRICHOVSKÝ, V. — LAZÁR, L. — KRAJNÍČÁKOVÁ, M. — KUBIS, P.: Biometrické parametre vaječníkov oviec plemena cigája a ich zmeny po podaní cloprostrenolu. *Veter. Med. (Praha)*, 30, 1985, s. 11—20.
- MARION, G. B. — GIER, H. T.: Factors affecting bovine ovarian activity after parturition. *J. anim. Sci.*, 27, 1968, s. 1621—1626.
- MCDONALD, L. E.: Veterinary endocrinology and reproduction. Philadelphia, Lea and Febiger, 1980.
- NISWENDER, G. D.: Luteolysis. In: SCHWARTZ, N. B. — HUNZICKER, — DUNN, M., (eds), Dynamics of ovarian function, Raven, New York, 1981, s. 153—160.
- PALMER, W. M. — TEAGUE, H. S. — VENZKE, W. G.: Macroscopic observations on the reproductive tract of the sow during lactations and early postweaning. *J. anim. Sci.*, 24, 1965, s. 1117—1125.
- PRESL, J. — BUKOVSKÝ, A.: Selekcce dominantního folikulu. II. Českoslov. Gynkol., 54, 1989, s. 284—300.
- SCHIRAR, A. — MARTINET, J.: Postpartum ovarium activity and its interaction with the uterus in resuming cyclic activity post partum. In: KARG, M. — SCHALLENBERGER, E.: Factors influencing fertility in the postpartum cow. The Hague (Boston). London, Martinus Nijhoff Publishers 1982, s. 67—94.
- TOKOŠ, M. — TOKOŠOVÁ, M. — ARENDARČIK, J.: Zmeny biometrie pohlavných orgánov u oviec po synchronizácii ruje a superovulácie v pripúšťacom období. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 1990, s. 31—36.
- TURNBULL, K. E. — BRADEN, A. W. — MATTNER, P. E.: The pattern of follicular growth and atresia in the ewe ovary. *Austral. J. biol. Sci.*, 30, 1977, s. 229—241.
- VAN NIEKERK, C. H.: Limitations to female reproductive efficiency. In: G. J. TOMES, D. E. — ROBERTSON, R. J. LIGHT, FOOTE and W. HARE-SIGN (ed.) *Sheep Breeding* (2 end) BUTTERWORTHS and Coltd. London, 1979, s. 303—313.
- VAN WYK, L. C. — VAN NIEKERK, C. H. — BELONJE, P. C.: Further observation the involution of the post partum uterus of the ewe. *J. South Afr. Veter. Assoc.*, 43, 1972, s. 29—33.
- WHYMAN, D. — MOORE, R. W.: Effects of PMSG and the prostaglandin F₂alpha analogue cloprostenol on superovulating fertilization and egg transport in the ewe. *J. Reprod. Fertil.*, 60, 1980, s. 267—272.
- ZRALÝ, Z. — KUMMER, V. — ČANDERLE, J.: Aktivita folikulárního systému ovaríí krav při rozdílném průběhu puerperia. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989, s. 593—602.

Došlo dňa 18. 10. 1990

KRAJNÍČÁKOVÁ, M. — ELEČKO, J. — BEKEOVÁ, E. — MARAČEK, I. — HENDRICHOVSKÝ, V. (Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice): *Biometric parameters of uterus and ovaries after administration of Depotocin inj. Spofa in early puerperia of sheep*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (10): 607—618.

Objectivisation of the physiological course of puerperium and control of involution processes of uterus represent topical questions of an increased frequency of lambing. Our study was directed at the determination of the weight, length of body and horns of uterus as well as of the weight, length, width and height of ovaries, following the administration of carbetocin (Depotocin inj. Spofa), in the puerperal period of Slovak Merino sheep. The study was aimed at obtaining objective biometric data on uterus and ovaries and recording the influence of carbetocin on the involution of uterus and ovaries of sheep. Thirty ewes, divided into two groups, were included in the experiment. The animals of the experimental group ($n = 15$) were subjected to treatment with carbetocin (Depotocin inj. Spofa) at the amount 2×0.07 mg. The first dose was applied intramuscularly (*i. m.*) on the 2nd day after parturition and the second dose was injected subcutaneously (*s. c.*) on the 4th day after lambing. The second group ($n = 15$) served as a control. Three ewes ($n = 3$) were bled on each of the following days: 1, 7, 17, 25 and 34 after parturition. After bleeding the sexual organs were removed by excision and their weight and the length of the body and horns of uterus and of ovaries was determined. The number and size of follicles were determined on the surface of ovaries. The weight of uterus body showed a declining tendency (Fig. 1, Tab. I) in sheep of the control group with a statistically significant decrease from the 17th till the 34th day after parturition ($P < 0.01$). Its weight varied from 56.0–14.6 to 5.2–0.3 g in the above-mentioned time interval. The experimental group showed a statistically significant decrease in weight as early as on the 7th day after lambing compared to the 1st day after parturition, down to the values 185.66–38.91 g ($P < 0.05$). The decrease in the weight of uterus body recorded on day 17 (106.56–41.08 g) was less pronounced than in the control group (Tab. I, Fig. 1). The final average weight of the body of uterus on the 34th day after parturition was 41.36–8.52 g, that means higher than in the control group (5.2–0.3 g). The weight of gravid horns in the experimental group declined significantly as early as on the 7th day after parturition to the average weight of 60.89–9.45 g and reached 9.86–3.49 g on the 34th day. A significant decrease in the weight of gravid horns was recorded in the control group on days 25 and 34 and their weight varied on average from 15.2–5.4 to 3.5–0.7 g ($P < 0.05$; $P < 0.01$, resp.). A statistically significant decrease in the weight of the non-gravid horns of uterus of ewes belonging to the control group was recorded on days 25 and 34 after parturition ($P < 0.05$). On the other hand, after the temporary nonsignificant increase on the 7th day after lambing of ewes of the control group, their weight reached the values of 3.1–0.80 g, with a statistically significant decline on the 34th day after lambing. A significant decrease in the length of uterus body (Fig. 2, Tab. II) was recorded in the control group of ewes between the 17th and the 34th day of observation ($P < 0.01$, $P < 0.001$, resp.). A decreased length of uterus body in the experimental group was observed up to the 25th day of observation, from 23.30 ± 1.22 to 10.96 ± 2.19 cm on average. Evaluation of the length of gravid horns of sheep of the experimental group showed its significant decrease on days 25 and 34 compared to the 1st day after lambing ($P < 0.05$, $P < 0.01$, resp.). Observation of the length of gravid horn in the control group showed at first the insignificant lengthening on day 7 and subsequent significant shortening as late as on the 34th day to the value of 9.7 ± 1.6 cm ($P < 0.05$). The average length of non-gravid horns in the experimental group on days 25 and 34 (Fig. 2, Tab. II) varied from 7.30 ± 0.7 to 8.37 ± 2.65 cm. In the control group, the increase in the length of non-gravid horn of uterus on the 7th day after lambing was replaced, similarly to the weight, by its gradual decrease up to the 34th day of observation and its length was 8.30 ± 2.20 cm. The weight of ipsilateral ovaries (Tab. V) was insignificantly higher in the experimental group in comparison with the control group. The presence of follicles divided into individual categories of both groups is summarized in Tab. VI. The number of small structures in the ipsilateral ovaries of the experimental group declined during the followed period in favour of the size and the number of follicles bigger than 3 to 5 mm on day 25 and bigger than 8.9–18 mm on day 34 after lambing. The obtained results of the followed parameters and their comparison with literary data suggest that:

- the average weight of the body and gravid horns of uterus decreased markedly on the 7th day after lambing in the experimental group, treated with carbetocin in early puerperium, in comparison with the control group,
- administration of carbetocin increased the average weight of both ovaries in the experimental group compared to the control group,
- physiological termination of the involution process in sheep of the Slovak Merino breed can be observed until the 34th day after parturition,

— the obtained results are important from the viewpoint of development of new methods applied to controlled reproduction of small ruminants and can prove useful in biotechnical procedures aimed at increasing the frequency of lambing.

ewe; puerpery; weight; uterus; ovary; follicles

Adresy autorov:

MVDr. Mária Krajničáková, CSc., prof. MVDr. Ján Elečko, CSc., MVDr. Eva Bekeová, CSc., doc. MVDr. Imrich Maraček, CSc., MVDr. Valentín Hendrichovský, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Duklianských hrdinov 1/A, 040 01 Košice

INZERCE

Redakce časopisu nabízí tuzemským i zahraničním firmám možnost inzerce na stránkách časopisu VETERINÁRNÍ MEDICÍNA. Prostřednictvím inzerátů uveřejňovaných v našem časopise budou o Vašich výrobcích informováni pracovníci z výzkumu a provozu u nás i v zahraničí.

Bližší informace získáte na adrese:

Redakce časopisu Veterinární medicína
k rukám ing. Z. Radošové
Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

PATOLOGICKO-MORFOLOGICKÉ A HISTOENZYMLOGICKÉ NÁLEZY PO INTOXIKÁCIÍ VX LÁTKOU (ORGANOFOSFÁT) U OVIEC

E. Švický, R. Škarda, J. Marcaník, J. Hrušovský

ŠVICKÝ, E. — ŠKARDA, R. — MARCANÍK, J. — HRUŠOVSKÝ, J. (Vysoká škola veterinárska, Košice): *Patologicko-morfologické a histoenzymologické nálezy po intoxikácii VX látkou (organofosfát) u oviec*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 619—623.

V práci sme sledovali patologicko-morfologické a histochemické zmeny po podaní VX látky v rôznych dávkach u oviec. Najvýraznejšie nálezy boli zistené na pľúcach vo forme edémov a akútnych katarálnych bronchopneumónií u zvierat, ktoré uhynuli do troch dní po aplikácii látky. Pod epikardom sme nachádzali buď ojedinelé, alebo rozsiahle plošné krvácaniny, ktorých rozsah nesúvisel s množstvom aplikovanej látky. V mozgu boli pomerne výrazne dilatované cievy, podobne aj v mozgových plénach. Histochemické vyšetrenia poukázali na značne nejednotnú aktivitu sledovaných enzýmov v rôznych orgánoch oviec.

ovce; VX látka (organofosfát); enzýmy; patologicko-morfologické nálezy

V súčasnej dobe na človeka a zvieratá pôsobí viac ako štyri milióny najrôznejších chemických látok, ktoré sú obsiahnuté v biosfére. Naviac ich počet každým rokom narastá zhruba o 4000 (K r a y b i l l, 1975). Ďalekosiahle účinky chemikálií boli napríklad demonštrované pri použití herbicídov v nadbytku v rámci vietnamského konfliktu, kde došlo k ťažkému narušeniu ekologickej rovnováhy v danej lokalite. K najtoxickejším zlúčeninám pre cicavce, včetine človeka, patria nízkomolekulárne synteticky pripravené látky zahŕňujúce alkylfosfáty, karbanáty, bicyklické fosfáty a polyhalogenbenzodioxíny (P a t o č k a a B a j g a r, 1974).

Na základe dlhodobého výskumu bola v USA pripravená zlúčenina kódovo označená ako VX; ide o otravnú látku so smrteľnými účinkami. Jej chemická štruktúra bola oficiálne zverejnená až v roku 1973 (S i d e l l a i., 1973). Jedná sa o 0-ethyl-S-2-diizopropylaminoethyl ester kyseliny methylthiofosforitej. Ako uvádzajú M c N a m a r a a i. (1973), je VX látka asi dvojnásobne toxickejšia v porovnaní so sarinom, ale zotavenie po jej účinku je asi štyrnásobne rýchlejšie než po sarine.

Stálosť VX látky je pomerne značná, vodu má zamorovať až pol roka, terén včetine pastvín v lete 1,5—2 týždne, v zime až niekoľko mesiacov. S týmito údajmi kontrastuje skutočnosť uvádzaná autormi V e r w e i j a B o t e r (1976), kde bola sledovaná degradácia VX v rôznych druhoch pôd v laboratórnych podmienkach. Použili model pieščitej, fľovitej a rašelinovej pôdy. Podľa ich zistenia je okolo 90 % VX látky degradované

v týchto pôdnych médiách behom 48 hodín, ostatných 10 % podstatne pomalšie. Autori pritom nekalkulovali s možnosťou podielu pôdnych mikroorganizmov na degradáciu VX látky, čo je v celej rade iných organofosfátov a rovnako karbanátov v literatúre popísané [Laveglia a Dahm, 1977].

Toxicita VX látky sa môže veľmi hrubo odhadovať i podľa pokusov na dobrovoľníkoch [Sidell a Groff, 1974]. Podávali intravenózne dávky $1,5\text{--}1,7\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ž. h., perorálne $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$. Klinická odozva odrážajúca sa v inhibícii obidvoch cholinesteráz nasvedčovala ľahkému priebehu otráv s dobrou prognózou. Dávky boli zrejme hlboko pod LD_{50} . Tak napr. po dávke $1,5\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ž. h. sa symptómy intoxikácie prezentovali na 1–2 min po aplikácii, inhibícia AChE v priemere 20 % z pôvodnej aktivity, maximálne klinické príznaky za 60 min po podaní noxy. Tachykardia a zvýšenie krvného tlaku boli zaznamenané za tri hodiny po aplikácii, miosis zaznamenaná nebola, VX látka inhibovala predovšetkým erytrocytárnu acetylcholinesterázu. Prirodzená obnova aktivity bola kompletná za 70 hodín. Najcharakteristickejšími klinickými príznakmi u oviec (van Kampen a i., 1969) boli stresy a záškľby cervikálnej svaloviny, rezultujúce v krčnej flexii a v neobvyklom držaní hlavy v pravom uhle k sternu, u ďalších bol zaznamenaný profúzny výtok z dutiny nosnej. Svalová slabosť bola najzrejmějšíu pri pokusoch dostať ovce do pohybu, u menej zasiahnutých dochádzalo k rýchlej únave, pozdšie sa neudržali na vlastných nohách. Histologickým vyšetrením uhynutých oviec neboli zistené žiadne zápalové či degeneratívne zmeny na nervovom systéme, ani kostrovej svalovine (van Kampen a i., 1969).

MATERIÁL A METÓDA

V pokuse bolo 61 oviec, ktorým bola podaná VX látka v rôznych dávkach a rôznym spôsobom. Potom bola vykonaná patologicko-anatomická pitva a odoberaté vzorky na histopatologické a histochemické vyšetrenie. Na histopatologické vyšetrenie boli odoberaté vzorky z mozgu, pečene, obličiek, steny bachora, tenkého čreva, kostrovej svaloviny, myokardu, pľúc a sleziny, ktoré sa fixovali v 4% formaldehyde. Z parafrínových bločkov narezané rezy sa farbili hematoxyln-eozínom a rezy robené na zmrazovacom mikrotóme z pečene a obličiek sa farbili Sudanom.

Pre histochemické vyšetrenie sa odoberali vzorky z jazyka, chrbtového svalu, jeju-na, bachora, pečene, obličiek a z medzirebrového svalu. Vzorky po odoberatí boli zmrazené v petroeteri na $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ a až do spracovania držané v mrazničke pri teplote $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Zo spomínaných vzoriek bola zisťovaná aktivita alkalickéj (AF) a kyslej fosfatázy (KF), nešpecifickej esterázy (NE), acetylcholinesterázy (AChE) a dehydrogenázy kyseliny mliečnej (LDH). Rezy na histochemické vyšetrenie aktivity sledovaných enzýmov boli robené na zmrazovacom mikrotóme po predchádzajúcej fixácii vo vychladenej Bakerovej tekutine ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$). Inkubácia bola robená vo vodnom médiu u všetkých enzýmov metódami, ktoré uviedol Loida a i. [1979].

VÝSLEDKY

VX látka bola aplikovaná ovciam v dávkach od $6,68$ do $134,0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ž. h. len u 4 oviec i. m. U väčšiny oviec sa dávky pohybovali od $26,21$ do $90,0\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ živej hmotnosti. Presné dávky u jednotlivých zvierat neuvádzame z toho dôvodu, že patologicko-anatomické nálezy nevykazovali rozdiel v závislosti od dávky podanej látky. U niektorých oviec bol súčasne so skúšanou látkou podávaný aj zeolit; pri pitve neboli zistené rozdielne patologicko-anatomické zmeny. Pokusné zvieratá hynuli

od 40 min do 3 dní po aplikácii látky. Celkový počet uhynutých zvierat bol 41. Ostatné zvieratá (20 kusov) boli odporázané v rozmedzí 21—41 dní po podaní látky. Pri pitve boli najvýraznejšie zmeny na srdci vo forme krvácanín pod epikardom (53 oviec). Rozsah a veľkosť krvácanín u uhynutých zvierat (od drobných bodkovitých až po veľké plošné) nie je možné dávať do súvisu s výškou aplikovanej dávky. U odporázaných zvierat neboli pozorované krvácaniny, ale u 12 kusov bola dilatácia pravej polovice srdca. Na pľúcach uhynutých oviec sme pozorovali edém s výraznou spenenou tekutinou, alebo akútnu katarálnu bronchopneumóniu u tých kusov (28), ktoré hynuli viac hodín alebo do 3 dní po podaní látky. V pečeni bola častá venostáza a ojedinelé, väčšinou ložiskové degeneratívne zmeny, ktoré nedávame do súvisu s aplikovanou látkou. V kôrovej časti obličiek sme u osemich oviec našli drobné bodkovité krvácaniny a epitel obličkových kanálikov bol porušený, ojedinele sme nachádzali aj extravazáty, hlavne v kôre obličiek. Extravazáty a dilatované cievy boli pozorované tiež v CNS a dilatované cievy aj na mozgových plénach. Na zažívacom aparáte u 12 pitvaných oviec boli ložiskové enteritídy katarálne až hemoragické. Pre komplexnosť pitevného nálezu uvádzame aj častý nález sarkosporidiózy a menej častú dikroceliózu a fasciolózu.

Histochemickým vyšetrením vykazovala AF veľmi silnú aktivitu v mikrovilóznei zóne enterocytov jejuna a v bunkách obličkových kanálikov, stredne silná aktivita bola v cievach a bunkách chuťových pohárikov jazyka, slabá až negatívna aktivita bola v nekeratinizujúcej sliznici bachora a v hepatocytoch.

KF vykazovala stredne silnú až silnú aktivitu v enterocytoch jejuna a v nekeratinizovaných bunkách bachora, mierna až stredne silná aktivita bola v sliznici jazyka a v bunkách obličkových kanálikov, negatívna až slabá v bunkách pečene.

NE sa prezentovala silnou aktivitou v nervových zakončeniach chrbtového a medzirebrového svalu, v enterocytoch jejuna ako aj v bunkách obličkových kanálikov, negatívna aktivita bola v pečeneových bunkách. Cholinesterázy vykazovali silnú až stredne silnú aktivitu v nervových zakončeniach jazyka, chrbtového a medzirebrového svalu. V ostatných vyšetrovaných orgánoch neboli prítomné.

LDH bola evidentná svojou veľmi silnou aktivitou vo svalových vláknach chrbtového a medzirebrového svalu, mierne až stredne silnou aktivitou vo svalových bunkách jazyka, hepatocytoch, v bunkách obličkových kanálikov, v sliznici a svalovej vrstve jejuna a v nekeratinizovaných bunkách bachora. Intenzita aktivity enzýmov v tkáňových rezoch bola u vyšetrovaných oviec približne rovnaká pri rôznych dávkach podanej látky.

DISKUSIA

V čase robenia pokusov v nám dostupnej literatúre sme nenachádzali údaje o patologicko-anatomických, histopatologických a histochemických nálezoch až na jeden prípad, kde bolo konštatované, že chronické pulmonálne lézie, portálne infiltrácie mononukleárov, glomerulonefritídy a intersticiálne nefritídy rozhodne nesúviseli s otravou anticholineste-

rázovou látkou. Histopatologickým vyšetrením uhynutých zvierat neboli zistené žiadne zápalové procesy či degeneratívne zmeny v centrálnom, periférnom nervovom systéme, či v kostrovej svalovine (van Kempen a i., 1969). Tak isto to bolo aj v našich pokusoch v uvedených orgánoch, ale napr. na pľúcach sme nachádzali u niektorých oviec edém pľúc a akútne katarálne bronchopneumónie a na srdci pod epikardom krvčanciny. Tieto nálezy boli najvýraznejšie spolu s dilatovanými cievmi v CNS na mozgových plénach. Pešice a i. (1972) uvádza, že kostrová svalovina (mäso) a orgány zo zvierat akútne otrávených orgánofosfátmi G a V typu nevykazujú zmeny farby, vzhľadu, vône a konzistencie.

Histochemické vyšetrenia ukázali, že cholinesterázy a nešpecifická esteráza mali nejednotnú intenzitu vo svojej aktivite v nervových zakončeníach jazyka, chrbtového a medzirebrového svalu. V pečeni, obličkách, jejunu a bachore bola enzymatická aktivita sledovaných enzýmov tiež značne nejednotná.

Literatúra

- KRAYBILL, H. F.: Pesticide toxicity and potential for cancer a proper perspective. *Pest Control*, 43, 1975, s. 9—16.
- LAVEGLIA, J. — DAHM, P. A.: Degradation of organophosphatal and carbamate insecticides in the soil and by soil microorganism. *Amer. Rev. Entomol.*, 22, 1977, s. 483 to 513.
- LOJDA, Z. — GOSSRAU, R. — SCHIEBLER, T. H.: *Enzyme histochemistry*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag 1979, 339 s.
- McNAMARA, B. P. — LEITNAKER, F. C. — VOCCI, P. J.: Proposed limits for human exposure to VX vapour in nonmilitary operations. *U. S. Natl. Techn. Inform. Serv.*, AD Rep. 1973, č. 770434/9GA, 49 s.
- PATOČKA, J. — BAJGAR, J.: Přehled nejtoxičtějších nízkomolekulárních sloučenin. In: *Symposium o bioorganické chemii*, Pardubice, 1974.
- PEŠIC, V. — OREŠKOVIČ, A. — RADOVIČ, L.: Mogucnost ishrane ljudi mesom zivotinja otrovanih organofosforim jedinjenjima. *Vejnosamit. Pregled.*, 29, 1972, s. 112—116.
- SIDELL, F. R. — CROFF, W. A.: The reactivability of cholinesterase inhibited by VX and sarin in men. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 27, 1974, s. 241—253.
- SIDELL, F. R. — ACHAJANIAN, G. K. — GROFF, W. A.: The reversal of anticholinergic intoxication in man with the cholinesterase inhibitor VX. *Proc. Soc. exp. Biol. Med.*, 144, 1973, s. 725—730.
- van KAMPEN, K. R. — JAMES, L. F. — RASMUSSEN, J. — HUFFAKER, R. H. — FAWCETT, M. O.: Organic phosphate poisonin of sheep in Skull Valley, Utah. *J. Amer. veter. med. Assoc.*, 154, 1969, s. 623—630.
- VERWEIJ, A. — BOTER, H. L.: Degradation of S-2-diisopropylaminoethyl-0-ethyl methylphosphonothivate in soil phosphorus containing producte. *Pestic. Sci.*, 7, 1976, s. 355—362.

Došlo dňa 5. 12. 1990

ŠVICKÝ, E. — ŠKARDA, R. — MARCANÍK, J. — HRUŠOVSKÝ, J. (University of Veterinary Medicine, Košice): *Patho-morphological and histo-enzymological findings after VX chemical (organophosphate) intoxication in sheep*. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991 (10): 619—623.

Sixty-one sheep were administered experimentally a VX chemical (organophosphate) at different rates. In the process of dissection, samples were taken for a histopathological examination. These were samples of brain, liver, kidneys, rumen wall, small intestine, muscles, myocardium, lungs and spleen. For another histochemical examination, samples of tongue, m. longissimus dorsi, jejunum, rumen, liver, kidneys and m. intercostalis were also taken. The activities of alkaline and acid phosphatase, nonspecific esterase, acetylcholinesterase and dehydrogenase of lactic acid were investigated. The most significant changes were found out in the lungs — in form of oedemas and acute catarrhal bronchopneumonias in those animals which died within three days after chemical administration. Sporadic haemorrhages or haemorrhages in form of vast spots were found out under the epicardium. Their range did

not relate to the amount of the chemical administered. Rather dilated vessels were observed in the brain and also in the meninges. The histochemical examination showed different activities of enzymes in particular organs of sheep.

sheep; VX chemical (organophosphate); enzymes; patho-morphological findings

Adresy autorov:

Doc. MVDr. Emil Švický, CSc., prof. MVDr. Rudolf Škarda, CSc., doc. MVDr. Jozef Marcaník, CSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 73, 041 81 Košice
Prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Čínská 35, 160 00 Praha 6

ADVERTISEMENT

The Editors of the magazine offer to the Czechoslovak as well as foreign firms the possibility of advertising on pages the VETERINÁRNÍ MEDICÍNA magazine. Through your adverts published in our magazine, the specialists both from the field of research and production will be informed about your products.

For a more detailed information, please contact:

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA
atth. ing. Zdena Radošová
Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství
Slezská 7
120 56 Praha 2

Z VĚDECKÉHO ŽIVOTA

60 LET PROF. MVDr. EMANUELA KRÁLE

Připomínáme-li si osmdesátiny nestora československé veterinární chirurgie a ortopedie prof. Emanuela Krále, dlouholetého vedoucího kliniky chirurgie a ortopedie Vysoké školy veterinární v Brně, uvědomujeme si, že dodnes platí všechno, co bylo napsáno při příležitosti jeho předcházejících jubileí.

Není třeba podrobně opakovat jeho životní dráhu, snad se sluší jen připomenout především mladší generaci, že se narodil 19. října 1911 v Kutné Hoře. Po absolvování studia na Vysoké škole zvěrolékařské nastupuje jako asistent na chirurgickou a oční kliniku a tato nastoupená pedagogická dráha se stává jeho životním údělem. Venia docenti pro obor veterinární chirurgie dosahuje v roce 1946, kdy současně je pověřen vedením kliniky. Profesorem je jmenován v roce 1949 a stává se vedoucím nově ustanovené katedry chirurgicko-porodnické a po reorganizaci vedoucím katedry chirurgie, ortopedie a rentgenologie. Představitelem oboru zůstává až do svého odchodu do důchodu v roce 1977.

Když v roce 1946 převzal vedení chirurgické a oční kliniky, začal plně uplatňovat své vynikající organizační a pedagogické schopnosti. Neváhá opustit teoretické pojetí onychologie a vedle chirurgické kliniky vytváří ortopedickou kliniku a samostatný studijní obor veterinární ortopedii. Současně mění i náplň tradovaných oborů tak, že tyto zahrnují i chirurgii a ortopedii sudokopytníků. Souběžně s uskutečňováním této koncepce zakládá při katedře dokonale vybavené rentgenologické oddělení. S pracovitostí, pílí a nadšením jemu vlastním se mu podařilo vybudovat plně fungující a dobře vybavené klinické pracoviště, jehož úroveň byla uznávána i v zahraničí. Několika tisícům absolventů studia veterinární medicíny, kteří navštěvovali jeho přednášky, je znám jako vynikající pedagog. Dokonalý přednes, perfektní doplnění přednášek názorným materiálem s využíváním audiovizuální techniky a závěrečná shrnutí zanechávaly u studentů vždy ucelený přehled. Své pedagogické nadání uplatnil plně i ve funkcích pedagogického prodávky a rektora. Stejnou pílí, jako připravě přednášek a řízení kliniky, věnoval i zajištění oboru učebními texty, vždy na úrovni doby, z nichž učebnice *Jurný — Král: Speciální veterinární chirurgie* zůstane dlouho chloubou nejen veterinární chirurgie, ale čs. veterinárního písemnictví vůbec.

Jeho pedagogická činnost je doplněna řadou vědeckovýzkumných prací. Pod jeho vedením se habilitovalo 5 učitelů, 13 pracovníků připravil k obhajobě kandidátské dizertační práce. Ve své vlastní vědeckovýzkumné činnosti se vždy zabýval aktuálními otázkami tradovaného oboru. Stěžejní místo v ní zaujímají práce věnované veterinární anesteziologii a ortopedickým onemocněním koně a skotu.

Ve své práci se prof. Král neomezoval pouze na své pracoviště, ale se stejnou pílí pracoval i mimo školu. Jeho zásada neustálého kontaktu s praktickými veterinárními lékaři byla korunována založením zájmové skupiny chirurgie, ortopedie a rentgenologie Vědecké společnosti čs. zootechniků a veterinárních lékařů, jejímž byl předsedou a byl skutečným inspirátorem činnosti později ustanovené Odborné sekce chirurgie Čs. společnosti veterinárních lékařů.

Je obdivuhodné, že jubilant našel i čas pro práci v mnoha komisích a radách, kde plně uplatňoval nejen své organizační a řídicí schopnosti, ale postupem času i své životní zkušenosti, moudrost a společenskou vytříbenost. Především významná byla jeho působnost předsedy či člena v redakčních radách odborných časopisů, v oborových radách Státní veterinární správy a v řadě dalších odborných a vědeckých komisí školy i mimo školu.

Prof. Král ani po odchodu do důchodu neustal ve své práci. Zůstala mu totiž vzácná harmonie duševní a tělesné svěžesti a nepřehledná zásoba bohatých odborných znalostí a zkušeností. Se stejným elánem jako v době svého aktivního působení se věnoval do budování nového chirurgického pavilónu, Muzea dějin veterinárního lékařství VŠV a plánům na další rozvoj školy a školních zemědělských podniků. Prakticky až do současné doby byl s úctou a respektem účastníkem dnů na škole, na klinice i na odborných zasedáních, kde je živou kronikou chirurgie.

Dílo učitele — jubilanta, který celý svůj život zasvětil studentům, spolupracovníkům oboru a celé naší škole, bude vždy připomínat vynikajícího člověka. A tak hledíme v tuto chvíli na prof. Krále s úctou a vděčností, kterou si plně zasluhuje.

Prof. MVDr. Jan Kottman, CSc.

Doc. MVDr. Ladislav Němeček, CSc.

AKTIVITA GLUTAMÁTDEHYDROGENÁZY A GLUTAMÍNSYNTETÁZY V TRÁVIACOM APARÁTE JEHNÍAT VO VZŤAHU K VEKU

K. Holovská, V. Lenártová, J. Koppel, I. Havassy, P. Javorský, E. Rybošová

HOLOVSKÁ, K. — LENÁRTOVÁ, V. — KOPPEL, J. — HAVASSY, I. — JAVORSKÝ, P. — RYBOŠOVÁ, E. [Vysoká škola veterinárská, Košice; Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice]: *Aktivita glutamátdehydrogenázy a glutamínsyntetázy v tráviacom aparáte jehniat vo vzťahu k veku*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 [10]: 625—632.

V pokusoch na jahňatách vo veku 10, 20, 30, 40 a 90 dní sme zistili v jednotlivých častiach tráviaceho aparátu nasledovné aktivity glutamátdehydrogenázy (GDH; E.C.1.4.1.2-4) a glutamínsyntetázy (GS; E.C.6.3.1.2): v tkanivách bachora, knihy, čepca, slezu, dvanástorníka, lačníka, bedrovníka, slepého a hrubého čreva sa aktivita GDH (NADH) menila od 0,031 do 0,305 nkat.mg⁻¹ sušiny, v obsahoch od 0 do 2,92 nkat.mg⁻¹ sušiny. Relatívne vysoké aktivity GDH (NADH) sa zistili v 90. dni veku v obsahu predžalúdkov, slepého a hrubého čreva, ako aj v 20. dni v obsahu slepého čreva a v 10. dni v obsahu hrubého čreva. Aktivita GDH (NADPH) bola v analyzovaných obsahoch tráviaceho aparátu nižšia ako aktivita GDH (NADH) a menila sa od 0 do 0,563 nkat.mg⁻¹ sušiny, pričom najvyššie hodnoty sa namerali v obsahu bachora a knihy v 40. dni a slepého čreva v 10. dni. Aktivita GS bola v tkanivách a obsahoch tráviaceho aparátu nízka (0,0 až 0,251 nkat.mg⁻¹ sušiny), najvyššie aktivity sa zistili v obsahu dvanástorníka, lačníka, bedrovníka. Výsledky ukazujú, že od 10 do 90 dní veku sú v jednotlivých častiach tráviaceho aparátu jahniat rozdielne možnosti využitia NH₃ cestou syntézy glutámovej kyseliny a glutamínu. V začiatočnom období života sa NH₃ utilizuje hlavne cestou GDH v obsahu slepého a hrubého čreva.

jahňatá; tráviaci trakt; amoniak využívajúce enzýmy; mikrobiológia

V predchádzajúcej práci (Holovská a i., 1979) sme zistili v jednotlivých častiach obsahu a tkanív tráviaceho aparátu oviec rozdielnu aktivitu enzýmov GDH (glutamátdehydrogenáza, E.C.1.4.1.2-4) a GS (glutamínsyntetáza, E.C.6.3.1.2), ktoré patria medzi najvýznamnejšie enzýmy využívajúce amoniak, produkovaný pri degradácii bielkovín a nebielkovinových dusíkatých látok krmiva počas trávenia. Autori, ktorí študovali biologické, fyziologické a praktické aspekty využitia amoniakálneho dusíka sa sústredili hlavne na metabolizmus prežúvavcov (Křivá a i., 1964; Joyner a Baldwin, 1966; Chalupa, 1973). K dispozícii sú len informácie o distribúcii a úlohe GDH a GS u dospelých prežúvavcov (Havassy, 1985), u ich mláďat chýbajú.

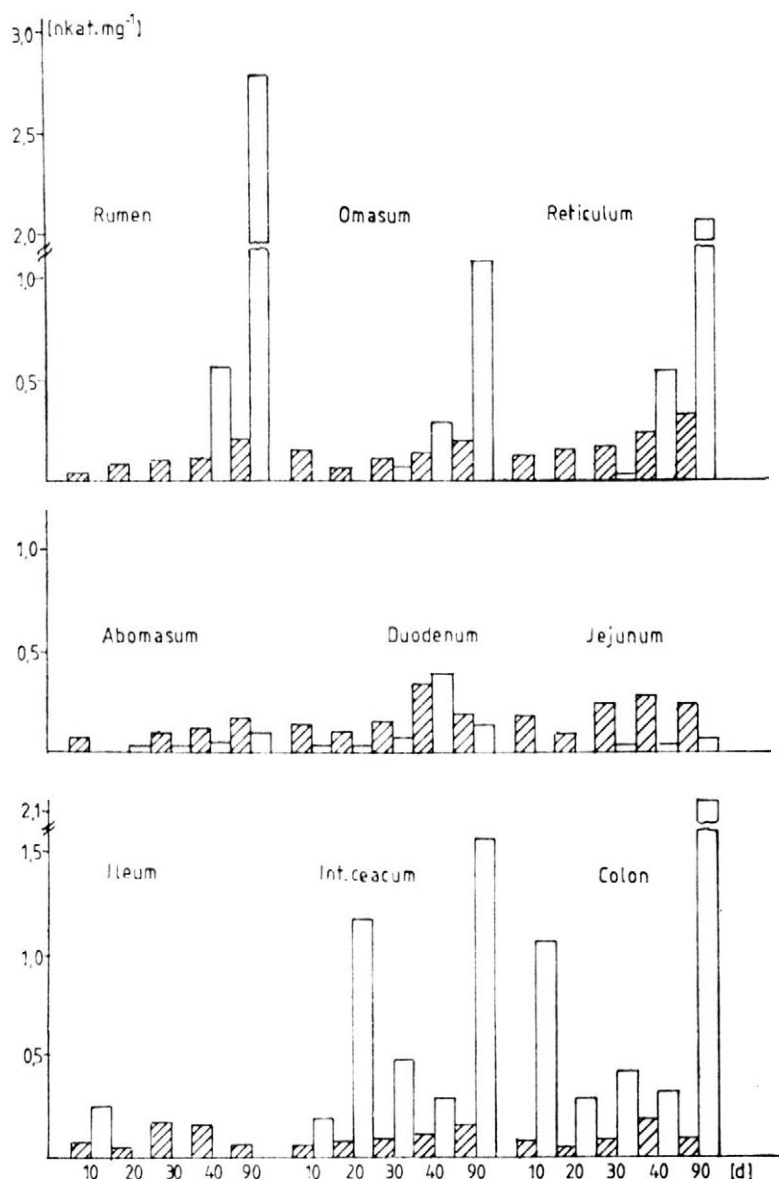
V našej práci sme preto skúmali dynamiku vývoja aktivity GDH a GS v jednotlivých častiach tráviaceho aparátu jahniat v závislosti na veku od 10 do 90 dní za účelom bližšieho objasnenia úlohy študovaných enzýmov pri ich dusíkovom metabolizme.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusy sme robili na 10 jahňatách plemena merino, ktoré boli odobraté od matiek 5.—7. deň po narodení a kŕmené mliečnou náhradkou trikrát denne po 500 ml, individuálne z fľašiek s cumľom. Zloženie použitej mliečnej náhradky (na báze sušeného kravského mlieka s 13,6 % tuku v sušine) v g.l⁻¹: proteíny 58, sacharidy 83, tuky 25. Jahňatá mali voľný prístup ku kvalitnému lúčnemu senu a sypkej zmesi ČOJ II. Po odstavbe vo veku 50 dní boli kŕmené sypkou zmesou ČOJ II a kvalitným lúčnym senom. Postupne v 10., 20., 30., 40. a 90. dni života, ráno o 8. hodine boli jahňatá zabitá. Tkanivá boli premyté fyziologickým roztokom, vysušené filtračným papierom. Z epitelu tráviaceho aparátu bol pripravený 20% homogenát v 0,01 mol.dm⁻³ fosfátovom pufrí, pH = 7,5, v Potter-Elvehjemovom sklenenom homogenizátore. Väčšie partikule boli odstránené centrifugáciou pri 300 g po dobu 10 min, pri teplote 4°C. Supernatanty boli použité na stanovenie enzýmovej aktivity. Obsahy boli zriedené fosfátovým pufrom, v koncentrácii 0,01 mol.dm⁻³, pH = 7,5, prefiltrované cez gázu a sonifikované za chladu na ultrazvukovom denzitegrátore MSE-Soniprep 150 štyri minúty. Glutamátdehydrogenázová aktivita, v smere redukčnej aminácie bola stanovená metódou podľa Friedena (1961) na základe oxidácie NADH, NADPH pri 340 nm. Glutamínsyntetázová aktivita bola stanovená metódou podľa Deuela a i. (1970) na základe stanovenia uvoľneného fosforu ako komplexu s molybdenom amónnym. Enzýmová aktivita bola vyjadrená v nkat.mg⁻¹ sušiny.

VÝSLEDKY

Zistené priemerné aktivity GDH (NADH, NADPH) a GS v jednotlivých častiach tráviaceho aparátu, v tkanivách a obsahu v 10., 20., 30., 40. a 90. dni života sú znázornené na obr. 1, 2, 3. Ako je vidieť z obr. 1 aktivita GDH (NADH) v tkanive bachora bola nízka a jej hodnota sa mierne zvyšovala so stúpajúcim vekom (0,031—0,188 nkat.mg⁻¹ sušiny). V obsahu bachora v 10., 20., 30. dni nebola zistená žiadna aktivita tohto enzýmu, v 40. dni sa začala zvyšovať (0,556 nkat.mg⁻¹ sušiny) a najvyššiu hodnotu dosiahla v 90. dni (2,92 nkat.mg⁻¹ sušiny). V tkanive knihy bola aktivita GDH v sledovanom období mierne zvýšená (0,155 až 0,183 nkat.mg⁻¹ sušiny) a v obsahu v 10.—20. dni nulová, v 30.—40. dni sa zvyšovala a najvyššiu hodnotu dosiahla v 90. dni (0,054—1,070 nkat.mg⁻¹ sušiny). V tkanive čepca sa namerali nízke a mierne stúpajúce hodnoty (0,106—0,305 nkat.mg⁻¹ sušiny), a v obsahu v 10., 20., 30. dni nulové, v 40. dni stúpajúce (0,533 nkat.mg⁻¹ sušiny) s maximum v 90. dni (2,16 nkat.mg⁻¹ sušiny). V tkanivách a obsahu slezu, dvanástorníka, lačníka, bedrovníka a slepého čreva bola aktivita GDH (NADH) nízka (0,043—0,146 nkat.mg⁻¹ sušiny). V obsahu slepého čreva sa zistila v 10. dni (0,186 nkat.mg⁻¹ sušiny), na 20. deň sa zvýšila (1,16 nkat.mg⁻¹ sušiny), potom mierne klesala (0,47—0,296 nkat.mg⁻¹ sušiny) a v 90. dni dosiahla najvyššiu hodnotu (1,57 nkat.mg⁻¹ sušiny). Aktivita GDH (NADH) v tkanive hrubého čreva bola nízka a mierne sa zvyšovala (0,062—0,097 nkat.mg⁻¹ sušiny), v obsahu hrubého čreva sa zistila v 10. dni (1,06 nkat.mg⁻¹ sušiny) a jej hodnoty potom klesali (0,28—0,313 nkat.mg⁻¹ sušiny) a znova sa zvýšili v 90. dni (2,15 nkat.mg⁻¹ sušiny).



1. Aktivita glutamátdehydrogenázy (NADH) v tráviacom aparáte jahniat vo vzťahu k veku [nkat.mg⁻¹ sušiny] — The activity of glutamate dehydrogenase (NADH) in the digestive tract of lambs, in relation to their age [nkat/mg dry matter]

Obsahy tráviaceho aparátu — Digesta:

vysoko významné rozdiely ($P < 0,01$) — highly significant differences ($P < 0,01$)

rumen: 40—30, 40—20, 40—10, 90—40, 90—30, 90—20, 90—10

omasum: 40—30, 40—20, 40—10, 90—40, 90—30, 90—20, 90—10

reticulum: 40—30, 40—20, 40—10, 90—40, 90—30, 90—20, 90—10

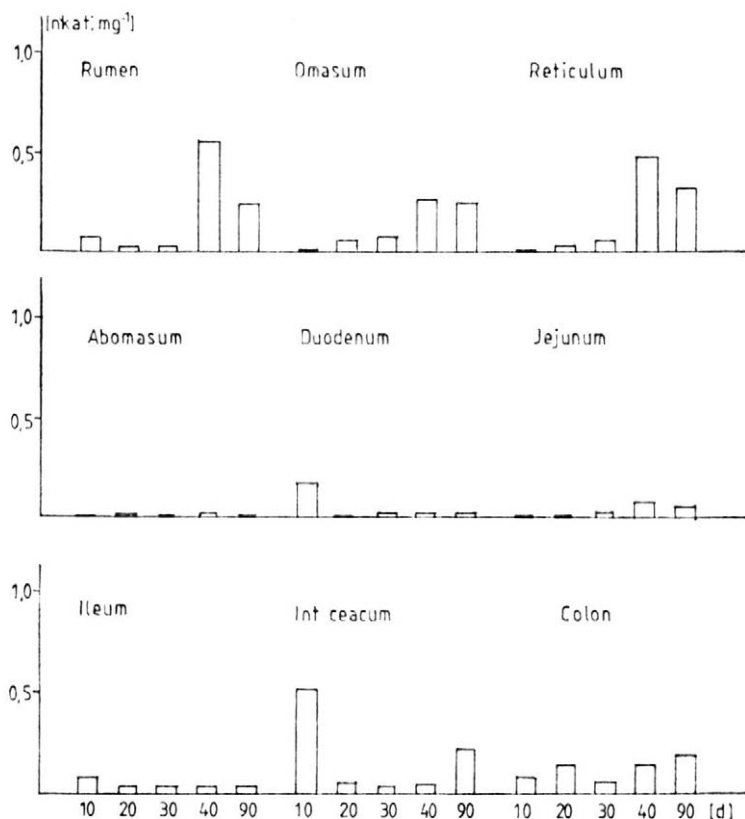
colon: 10—20, 10—30, 10—40, 10—90, 90—40, 90—30, 90—20, 90—10

int. caecum: 20—10, 90—10, 90—40

významné rozdiely ($P < 0,05$) — significant differences ($P < 0,05$)

int. caecum: 20—30, 20—40, 20—90, 90—30

Aktivita GDH (NADPH) — obr. 2, ktorá bola analyzovaná iba v obsahu tráviaceho aparátu jahniat, bola v porovnaní s aktivitou GDH (NADH), nižšia. Najvyššiu aktivitu sme pozorovali v obsahu bachora: v 10., 20., 30. dni bola aktivita nízka (0,069; 0,029; 0,030 nkat.mg⁻¹ sušiny), v 40. dni dosiahla najvyššiu hodnotu (0,563 nkat.mg⁻¹ sušiny) a v 90. dni



2. Aktivita glutamátdehydrogenázy (NADPH) v tráviacom aparáte jahniat vo vzťahu k veku [nkat.mg⁻¹ sušiny] — The activity of glutamate dehydrogenase (NADPH) in the digestive tract of lambs, in relation to their age [nkat/mg dry matter]

Obsahy tráviaceho aparátu — Digesta:

vysoko významné rozdiely ($P < 0,01$) — highly significant differences ($P < 0,01$)

rumen: 40—10, 40—20, 40—30, 40—90, 90—10, 90—20, 90—30

reticulum: 40—10, 40—20, 40—30, 90—10, 90—20

int. caecum: 10—20, 10—30, 10—40

významné rozdiely ($P < 0,05$) — significant differences ($P < 0,05$)

omasum: 40—10, 40—20, 40—30, 90—10, 90—20, 90—30

reticulum: 90—30

int. caecum: 90—10, 90—20, 90—30, 90—40

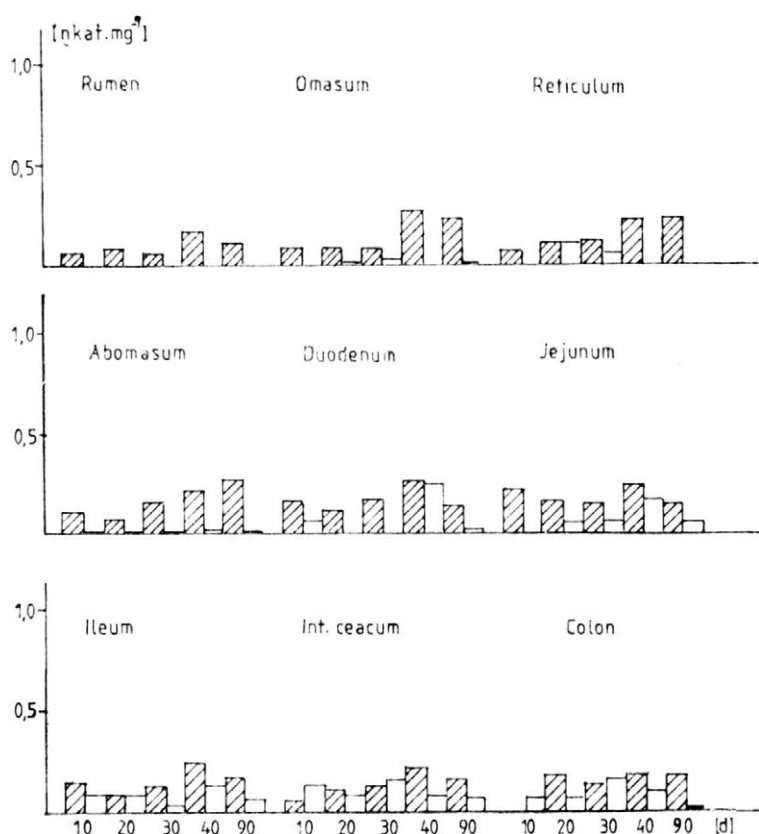
Vysvětlivky pro obr. 1—2 — Explanatory notes to Figs. 1—2

/// — aktivita GDH v tkanive tráviaceho aparátu — GDH activity in the tissue of digestive tract

□ — aktivita GDH v obsahu tráviaceho aparátu — GDH activity in the digesta

jej hodnota klesla ($0,250 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny). V obsahu knihy a čepca aktivita GDH (NADPH) sa mierne zvyšovala ($0,0—0,048 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny; $0,0—0,045 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny); maximum bolo namerané v 40. dni ($0,242 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny; $0,475 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny) a v 90. dni jej hodnoty klesali ($0,223 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny; $0,313 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny). V obsahu slezu, dvanástorníka, lačníka a bedrovníka boli aktivity veľmi nízke. V obsahu slepého čreva aktivita GDH (NADPH) bola najvyššia v 10. dni ($0,528 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny), potom klesala a znovu sa zvýšila v 90. dni ($0,206 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny).

Aktivita GS (obr. 3) v tkanivách a obsahu tráviaceho aparátu bola nízka. V tkanive bachora, knihy a čepca so stúpajúcim vekom sa aktivita zvyšovala ($0,059—0,117 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny; $0,081—0,229 \text{ nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny) a v obsahoch nebola zistená



3. Aktivita glutamínsyntetázy [GS] v tráviacom aparáte jahniat vo vzťahu k veku [$\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ sušiny] — The activity of glutamine synthetase (GS) in the digestive tract of lambs, in relation to their age [$\text{nkat} \cdot \text{mg}^{-1}$ dry matter]

//// — aktivita GS v tkanive tráviaceho aparátu — GS activity in the tissues of digestive tract

□ — aktivita GS v obsahu tráviaceho aparátu — GS activity in the digesta

okrem obsahu čepca, kde v 20. a 30. dni sa namerala veľmi nízka aktivita (0,105; 0,042 nkat.mg⁻¹ sušiny). V obsahu slezu bola aktivita GS veľmi nízka a v obsahu dvanástorníka, lačníka a bedrovníka sa namerali maximálne hodnoty v 40. dni (0,251; 0,178; 0,128 nkat.mg⁻¹ sušiny).

Výsledky ukazujú, že od 10 do 90 dní života jahniat enzýmová aktivita GDH (NADH), GDH (NADPH) a GS v jednotlivých častiach aparátu je rozdielna a mení sa od 0 do 2,92 nkat.mg⁻¹ sušiny. Najvyššie hodnoty GDH (NADH) sa zistili z 90. dni veku v obsahoch predžalúdkov, slepého a hrubého čreva. Pomerne vysoké hodnoty sa zistili ešte v obsahoch slepého čreva v 20. dni veku a hrubého čreva v 10. dni veku. Najvyššie hodnoty GDH (NADPH) sa zistili v obsahu bachora a knihy v 40. dni veku a v obsahu slepého čreva v 10. dni veku.

DISKUSIA

Z prác viacerých autorov je známe, že tráviaci aparát má vlastnú tkanivovú GDH a GS (Yde, 1969; Chalupa a i., 1970; Holovská a i., 1979). Glutamátdehydrogenáza zo sliznice bachora oviec bola purifikovaná a bližšie biochemicky charakterizovaná (Lenártová a i., 1979). V obsahoch tráviaceho aparátu sme zisťovali aktivitu GDH s koenzýmom NADH aj NADPH, a to z toho dôvodu, že jednoduchý organizmus (baktérie, huby, rastliny) má dve rozdielne glutamátdehydrogenázy, ktoré sa navzájom líšia koenzýmovou špecificitou na rozdiel od GDH živočíšneho pôvodu, ktorá môže rovnako dobre využívať koenzým NADH aj NADPH (Fahien a i., 1965; Frieden, 1964). V obsahoch tráviaceho aparátu jahniat sme zistili výrazne vyššiu aktivitu GDH s koenzýmom NADH, podobne ako Palmquist a Baldwin (1966) a Chalupa a i. (1970). Pri sledovaní dynamiky GDH (NADH, NADPH) v obsahoch tráviaceho aparátu jahniat, sme pozorovali relatívne vysokú aktivitu GDH (NADH) v 10. dni veku v obsahu hrubého čreva a GDH (NADPH) v obsahu slepého čreva. V 20. dni veku sa namerala tiež v obsahu slepého čreva vysoká aktivita GDH (NADH). V tomto období nebola nameraná žiadna aktivita GDH (NADH, NADPH) v obsahoch bachora, knihy a čepca. Aktivita GDH (NADH, NADPH) sa zvyšovala až v 40. dni a v 90. dni boli hodnoty GDH (NADH) najvyššie nielen v obsahoch bachora, knihy a čepca, ale aj v obsahu slepého a hrubého čreva. Fonty a i. (1984), ktorí sledovali koncentráciu amoniaku v bachore v tomto období, udávajú, že v 10. dni veku zistili pomerne vysokú koncentráciu amoniaku, a približne v 40. dni, to znamená v období začiatku metabolickej aktivity bachorovej mikroflóry, znižovanie koncentrácie amoniaku. V našej práci sme v tomto období zaznamenali zvyšovanie aktivity GDH (NADH, NADPH) v obsahoch bachora, knihy, čepca. Najvyššia aktivita GDH (NADH, NADPH) v nami študovanom období bola v 90. dni, t. j. v období, keď sa končí histologický vývin štruktúry bachora a predžalúdky začínajú vykonávať svoju funkciu. Naše výsledky ukazujú, že v období, kým sa skončí histologický vývin štruktúry bachora a predžalúdky začnú vykonávať svoju funkciu, utilizácia amoniaku cestou GDH sa uskutočňuje hlavne v obsahoch slepého čreva a hrubého čreva. Poukazujú na to vysoké aktivity GDH (NADH, NADPH) v obsahu slepého čreva v 10. a 20. dni a GDH (NADH) v obsahu hrubého čreva v 10. dni. Možnosť významnej utilizácie dusíka v slepom čreve

potvrďujú aj pokusy N o l a n a a i. (1976), ktorí zistili, že až 25 % endogénnej močoviny sa degraduje v slepom čreve. V tomto období, aktivita GS v obsahoch jednotlivých častí tráviaceho aparátu bola nízka. Môže to súvisieť so skutočnosťou, že vyššia koncentrácia amoniaku pôsobí inhibične na aktivitu GS. Aj H o w i t h a G r e s s h o f f (1985) pozorovali v čistých bakteriálnych kultúrach, že GS môže byť biochemicky kontrolovaná pomocou koncentrácie amoniaku. Dôležitú úlohu tu zohrávajú aj akceptory amoniaku (2-oxoglutarát, pyruvát), pretože ich koncentrácia môže limitovať inkorporáciu amoniaku. Možný priamy vplyv amoniaku na enzýmovú aktivitu a regulácia produkcie akceptorov amoniaku sú otázky, ktoré bude potrebné bližšie objasniť.

Naše výsledky ukazujú vývoj sledovaných enzýmových aktivít v tráviacom aparáte jahniat, v obsahu aj tkanive vo veku 10–90 dní. Na základe našich výsledkov môžeme predpokladať, že utilizácia amoniaku na syntézu aminokyselín cestou GDH a transaminácie sa uskutočňuje v prvom období života v obsahu slepého a hrubého čreva. V období, keď sa skončí histologický vývin štruktúry bachora, predpoklady pre enzymatickú syntézu kyseliny glutámovej a glutamínu sú hlavne v obsahu bachora, knihy, čepca, slepého a hrubého čreva, ale aj v stenách a obsahoch všetkých častí tráviaceho aparátu.

Literatúra

- DEUEL, F. T. — GINSBURG, A. — YEH, J. — SHELOU, E. — STADTMAN, F. R.: *Bacillus subtilis* glutamine synthetase. Purification and physical characterization. *J. biol. Chem.*, 245, 1970, s. 5195–5205.
- FAHIEN, L. — WIGGERT, B. O. — COHENN, P. P.: Effect of nucleotides and coenzymes on frog liver glutamate dehydrogenase. *J. biol. Chem.*, 240, 1965, s. 1091–1095.
- FONTY, G. — JOUANY, J. P. — SENAUD, J. — GOUET, P. H. — GRAIN, J.: The evolution of microflora, microfauna and digestive in the rumen of lambs from birth to 4 months. *Can. J. anim. Sci.*, 64, 1984, s. 165–166.
- FRIEDEN, C.: Coenzyme binding observed by fluorescence enhancement apparently unrelated to the enzymatic activity of glutamic dehydrogenase. *Biochim. biophys. Acta.*, 41, 1961, s. 428–430.
- FRIEDEN, C.: Relationship between subunit structure and activity for beef liver glutamic dehydrogenase. *Brookhaven Symposia in Biology*, 17, 1964, s. 98–116.
- HAVASSY, I.: Urea nitrogen utilization for the synthesis of amino acids and nucleic in ruminants. *Scientific works of the Institute of Animal Physiology of the Slovak academy of Sciences*, 1985, s. 77–96.
- HOLOVSKÁ, K. — LENÁRTOVÁ, V. — HAVASSY, I.: Distribution of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase activity in the sheep and chicken digestive tract. *Physiol. bohemoslov.*, 28, 1979, s. 145–150.
- HOWITH, S. M. — GRESSHOFF, P. M.: Ammonia regulation of glutamine synthetase in *Rhizobium* sp. ANU 289. *J. gen. Microbiol.*, 131, 1985, s. 1433–1440.
- CHALUPA, W.: Utilization of animal protein. *Proc. Nutr. Soc.*, 32, 1973, s. 99–105.
- CHALUPA, W. — CLARK, J. — POLIGER, P. — LAVKER, P.: Ammonia metabolism in rumen bacteria and musoca from sheep fed soy protein or urea. *J. Nutr.*, 100, 1970, s. 161–169.
- JOYNER, A. E. — BALDWIN, R. D.: Enzymatic studies of pure cultures of rumen microorganism. *J. Bact.*, 92, 1966, s. 1321–1330.
- KRKAJICA, S. — KURELEC, B. — MARTINČIČ, T.: Enzymatic investigations in the mucosa of the rumen. *Veter. Arch.*, 39, 1964, s. 94–100.
- LENÁRTOVÁ, V. — HOLOVSKÁ, K. — HAVASSY, I. — BOĎA, K.: Glutamate dehydrogenase in the digestive tract of sheep. *Ann. Rech. Veter.*, 10, 1979, s. 488–490.
- NOLAN, S. V. — NORTON, B. W. — LENG, R. A.: Further studies of the dynamics of nitrogen metabolism in sheep. *Brit. J. Nutr.*, 35, 1976, s. 127–147.
- PALMQUIST, J. D. — BALDWIN, P. L.: Enzymatic techniques for the study of pathways of carbohydrate utilization in the rumen. *Appl. Microbiol.*, 14, 1966, s. 60–69.

HOLOVSKÁ, K. — LENÁRTOVÁ, V. — KOPPEL, J. — HAVASSY, I. — JAVORSKÝ, P. — RYBOŠOVÁ, E. (University of Veterinary Medicine, Košice; Institute of Animal Physiology of the Slovak Academy of Sciences, Košice): *The activity of glutamate dehydrogenase and glutamine synthetase in the digestive tract of lambs in relation to their age*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 625–632.

Developmental dynamics was investigated in the activity of glutamate dehydrogenase (GDH, E.C. 1.4.1.2.-4) and glutamine synthetase (GS, E.C. 6.3.1.2) in different parts of the digestive tract of lambs, in dependence on the age from 10 to 90 days; the goal of these investigations was to elucidate in greater detail the role of the above enzymes in nitrogen metabolism. The activity of GDH, and of the coenzymes NADH and NADPH, was followed in the digesta because simple organisms (bacteria, fungi, plants) have two glutamate dehydrogenases: they differ from each other by coenzyme specificity, unlike GDH from animal sources which can utilize both NADH coenzyme and NADPH coenzyme (Fahien et al., 1965; Frieden, 1964). The following activities of GDH and GS were found out in trials with lambs at the age of 10, 20, 30, 40 and 90 days, as to the different parts of digestive tract: in the tissues of rumen, omasum, reticulum, spleen, duodenum, jejunum, ileum, int. caecum and colon the activity of GDH (NADH) varied from 0.031 to 0.305 nkat/mg dry matter, in the digesta from 0 to 2.92 nkat/mg dry matter (Fig. 1). An investigation of GDH (NADH, NADPH) dynamics in the digesta of lambs (Figs. 1 and 2) showed the relatively high activity of GDH (NADH) in the digesta of colon at the age of 10 days and that of GDH (NADPH) in the digesta of int. caecum. The activity of GDH (NADH) was also found to be high in the digesta of int. caecum at the age of 20 days. In that period the activity of GDH (NADH, NADPH) in the digesta of rumen, omasum and reticulum was zero. The activity of GDH (NADH, NADPH) began to increase on day 40, and on day 90 the GDH (NADH) values were highest not only in the digesta of rumen, omasum and reticulum but also in the digesta of int. caecum and colon. Similarly like Palmquist and Baldwin (1966), and Chalupa et al. (1970), we observed the markedly lower activity of GDH (NADPH) in comparison with GDH (NADH). The activity of GDH (NADPH) varied from 0 to 0.563 nkat/mg dry matter; the highest values were recorded in the digesta of rumen and omasum on day 40 and in the digesta of int. caecum on day 10 (Fig. 2). The activity of GS (Fig. 3) was low in the tissues of digestive tract and in the digesta of the whole apparatus (0.0–0.251 nkat/mg dry matter), the highest values were found in the digesta of duodenum, jejunum and ileum. The results of our experiments show that there are different possibilities of NH_3 utilization, by means of glutamic acid and glutamine synthesis, in the different parts of digestive tract in lambs. Before the histological evolution of rumen structure is finished and the proventriculi begin to function, ammonia utilization through GDH takes place mainly in the digesta of int. caecum and colon. A possibility of significant nitrogen utilization in the caecum was also confirmed in the experiments by Nolan et al. (1976), who found out that as much as 25 % of endogenic urea was degraded in the caecum. In that period the activity of GS in the digesta of the different parts of digestive apparatus was low. It may be related to the fact that the higher ammonia concentrations inhibit the activity of GS (Fonty et al., 1984). Until completion of the histological evolution of rumen structure is finished, the conditions for the enzymatic synthesis of glutamic acid and glutamine are created mainly in the digesta of rumen, omasum, reticulum and colon, and also in the walls and digesta of all parts of digestive apparatus.

lambs; digestive tract; ammonia-utilizing enzymes; microflora

Adresy autorov:

Ing. Katarína Holovská, CSc., doc. ing. Viera Lenártová, CSc., Vysoká škola veterinárská, Komenského 73, 041 81 Košice
MVDr. Juraj Koppel, CSc., ing. Ivan Havassy, DrSc., MVDr. Peter Javorský, MVDr. Elena Rybošová, CSc., Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Dukelských hrdinov 1/B, 040 01 Košice

F. Ništiar, P. Mižik, R. REXA, J. Mojžiš, J. Hrušovský, Š. Ivanko,
A. Ništiarová

NIŠTIAR, F. — MIŽIK, P. — REXA, R. — MOJŽIŠ, J. — HRUŠOVSKÝ, J. — IVANKO, Š. — NIŠTIAROVÁ, A. (Lekárska fakulta UPJŠ, Košice; Vojenský veterinárny doškolovací a výskumný ústav, Košice; Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Košice; Vysoká škola veterinárska, Košice): *Vplyv gama-žiarenia na Tetrahymena pyriformis kmeň W*. Veter. Med. (Praha), 36, 1991 (10): 633—637.

Tetrahymena pyriformis kmeň W bol vystavený piatim rôznym dávkam gama-žiarenia. Pri dávkach 102,1 a 204,2 Gy preživali všetky ožiarené bunky. Pri dávke 408,4 Gy prežilo 60,6 % ožiarených buniek, pri dávke 816,7 Gy len 8,8 percenta buniek, zatiaľ čo pri dávke 1633,4 Gy neprežila žiadna bunka. Po následnej kultivácii ožiarených buniek sa predlžil generačný čas v závislosti na aplikovanej dávke žiarenia.

Tetrahymena pyriformis; gama-žiarenie; LD₅₀; generačný čas

Už viac ako desať rokov sa zoberáme s využitím prvoka *T. pyriformis* kmeň W na štúdium účinkov toxických látok (Ništiar a i., 1981, 1984, 1985; Ništiar a Ništiarová, 1983), mykotoxínov (Ništiar a i., 1986), faktorov virulencie baktérií (Ništiar a i., 1990) a ultrafialového žiarenia (Ništiar a i., 1983). Z literatúry je známe, že *T. pyriformis* je relatívne rezistentný voči žiareniu X. Hodnoty LD₅₀ kolíšu v závislosti na použitom kmeni od 1,2 do 1,5 kGy (Wells, 1960; Calkins, 1966). Širší rozsah hodnôt LD₅₀ bol zistený pri ožiarení *T. pyriformis* gama-žiarením z rádionuklidu ⁶⁰Co. Pri ožiarení *T. pyriformis* gama-žiarením z rádionuklidu ⁶⁰Co, zistili Gebicki a i. (1980) výraznú závislosť hodnoty LD₅₀ na spôsobe ožiarenia (či bola ožiarená suspenzia prvkov alebo len jednotlivé bunky), na kmeni prvoka alebo médiu (či prvoky rástli v proteóza-peptónovom médiu, fosfátovom pufry a pod.). Rozsah týchto hodnôt (LD₅₀) určili v rozmedzí 150—6000 Gy. Tieto výsledky nás motivovali k overeniu účinku gama-žiarenia na prvoka *T. pyriformis* kmeň W.

MATERIÁL A METÓDA

Prvok *T. pyriformis* kmeň W bol kultivovaný v médiu, ktoré pozostávalo z 0,1 % proteóza-peptónu (fy Difco) a 0,01 % kvasničného extraktu (fy Oxoid). Do pokusov sme použili 12hodinové kultúry o denzite 50 000 prvkov na 1 ml kultivačného média.

Ožarovanie prvkov sme vykonali na ožarovacom zariadení Chisostat (^{60}Co) s dávkovým príkonom 2,8356 Gy.s⁻¹.

Kultúry v Petriho miskách boli vystavené dávkam 102,1 Gy, 204,2 Gy, 408,4 Gy, 816,7 Gy a 1633,4 Gy.

Počet prežívajúcich buniek *T. pyriformis* bol stanovený (po vitálnom farbení) ihneď po ožiarení priamym počítaním vo Fuchs-Rosenthalových komôrkach (Ništiar a i., 1981). Hodnota LD₅₀ bola stanovená metódou Spearman-Kärber (Finney, 1952).

Dĺžka generačného času (Horváth, 1974) bola stanovená po následnej kultivácii ožiarených suspenzií prvkov medzi 24. a 48. hodinou (čo zodpovedá exponenciálnej fáze rastu populácie) na základe priameho stanovenia počtu buniek. Kultivácia bola zahájená pri denzite 10 buniek.ml⁻¹.

V jednej sérii pokusov sme ožarovali médium pri uvedených dávkach a potom sme ho inokulovali prvkami. Rastovú krivku prvkov v ožiarených médiach sme porovnali s rastovou krivkou prvkov porastených v neožiarenom médiu po 24hodinovej kultivácii.

Vo všetkých pokusoch sme vykonali 24 paralelných vzoriek.

VÝSLEDKY

Pri ožarovaní prvoka *T. pyriformis* kmeň W gama-žiarením (tab. I) dávkou 102,1 Gy a 204,2 Gy nebol zistený letálny účinok. Pri dávke 408,4 Gy prežilo 60,6 % ožiarených buniek. Pri dávke 816,7 Gy prežilo len 8,8 % ožiarených buniek, zatiaľ čo pri dávke 1633,4 Gy neprežila

I. Vplyv gama-žiarenia na prežívanie *Tetrahymena pyriformis* kmeň W (TPW) — The effects of gamma-radiation on the survival of *Tetrahymena pyriformis*, W strain (TPW)

Dávka ¹ [Gy]	Počet buniek TPW ²		Letalita ³ (%)
	živé ⁴	zabité ⁵	
1 633,4	0	50 000	100,0
816,7	4 400	45 600	91,2
408,4	30 300	19 700	39,4
204,2	50 000	0	0
102,1	50 000	0	0

LD₅₀ metódou Spearman-Kärber = 467,0 ± 4,0 Gy⁶

¹dose, ²number of TPW cells, ³lethality, ⁴live, ⁵killed, ⁶LD₅₀ using Spearman-Kärber method = 467.0 ± 4.0 Gy

II. Vplyv gama-žiarenia na generačný čas *Tetrahymena pyriformis* kmeň W — The effects of gamma-radiation on the generation time of *Tetrahymena pyriformis*, W strain

Dávka ¹ [Gy]	0 h	24 h	48 h	Generačný čas ² [h]
0 (K ³)	10	1 216	1 686 958	2,48
204,2	10	1 188	405 461	2,88
408,4	10	624	14 752	5,36
816,7	10	338	2 605	8,20

¹dose, ²generation time, ³K (control)

žiadna bunka. Pri výpočte LD₅₀ metódou Spearman-Kärber bola táto hodnota stanovená na 467 ± 4 Gy. LD₁₀₀ je vyššia než 816,7 Gy pre dané usporiadanie pokusov.

V prípade, že sme bunky po ožiarení ďalej kultivovali a stanovili ich počty po 24 a po 48 hodinách, zistili sme, že generačný čas, ktorý u neožiarených kontrolných populácií je 2,48 hodín sa predlžil úmerne výške dávky žiarenia. Pri dávke 204,2 Gy predstavoval 2,88 hodín, pri 408,4 Gy 5,36 hodín a pri dávke 816,7 Gy 8,2 hodín. Výsledky z tohto pokusu prezentujeme v tab. II.

V sérii pokusov, kde sme ožiarovali médium a potom ho inokulovali neožiarenými tetrahymenami, nezistili sme oproti kontrolným skupinám signifikantné zmeny. Výsledky sú uvedené v tab. III.

III. Vplyv ožiarených médií na rast neožiarených buniek *Tetrahymena pyriformis* kmeň W (TPW) — The effects of irradiated media on the growth of nonirradiated cells of *Tetrahymena pyriformis*, W strain (TPW)

Dávka ¹ (Gy)	Počet buniek TPW ²	Kontrola ³ (%)
0 (K ³)	248 322 ± 284	100,0
102,1	249 688 ± 364	100,5
204,2	247 928 ± 314	99,8
408,4	248 096 ± 372	99,9
816,7	247 896 ± 338	99,8
1 633,4	245 998 ± 402	99,1

¹dose, ²number of cells TPW, ³K (control)

DISKUSIA

Nami zistená hodnota LD₅₀ 467,0 Gy je v korelácii s údajmi zo svetovej literatúry (Gebicki a i., 1980). Za prínos považujeme to, že táto hodnota bola získaná v prísne definovaných podmienkach a predstavuje dobrú východziu hodnotu pre pokusy na štúdium kombinovaného účinku gama-žiarenia a xenobiotík, najmä tých, ktoré predstavujú častý pollutant životného prostredia.

Zaujímavé sú aj výsledky týkajúce sa predĺženia generačného času v závislosti na dávke žiarenia. Tento vzťah zatiaľ vo svetovej literatúre nebol dostatočne preskúmaný. V tejto oblasti sme zistili zrovnateľné výsledky aj pre ultrafialové žiarenie (Ništšiar a i., 1983).

V sérii pokusov, kde sme ožiarovali médium a potom ho inokulovali neožiarenými tetrahymenami sme potvrdili, že použité dávky gama-žiarenia nenarušili živiny prítomné v médiu z hľadiska ich nutričnej hodnoty.

Na základe získaných výsledkov je možné konštatovať, že test-objekt *T. pyriformis* kmeň W je vhodným biologickým modelom pre štúdium účinku rôznych druhov ionizujúceho žiarenia na úrovni bunky ako aj populácie. Domnievame sa, že uvedené výsledky bude potrebné doplniť o ďalšie štúdiá zamerané na patobiochemický účinok gama-žiarenia. V ďalších pokusoch sa zameriame na štúdium kombinovaného účinku gama-žiarenia a vybraných xenobiotík ako aj na štúdium rádiotoxického účinku vybraných rádionuklidov za účelom vypracovania jednoduchého modelu na screening týchto látok v biologických materiáloch a v životnom prostredí.

Literatúra

- CALKINS, J.: Studies on the response of *Tetrahymena pyriformis* irradiated at various times in the growth cycle. *Radiat. Res.*, 27, 1966, s. 496—500.
- FINNEY, D. J.: Statistical method in biological assay. Griffin, London, 1952.
- GEBICKI, J. M. — DARLINGTON, J. L. — BAUMGARTNER, S.: The effect of extracellular environment on the sensitivity of two strains of *Tetrahymena* to gamma rays. *Int. J. Radiat. Biol.*, 38, 1980, s. 473—477.
- HORVÁTH, I.: Kvantitatív mikrobiológiai eljárások. Akadémiai Kiadó, Budapest, 1974, s. 87—91.
- NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — BENEŠ, J.: Využitie prvoka *Tetrahymena pyriformis* pre testovanie kontaminácie biologických materiálov organofosfátmi a karbamátmi. *Veter. Med. [Praha]*, 26, 1981, s. 695—700.
- NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J.: Vplyv niektorých pesticídov na prvoka *Tetrahymena pyriformis*. *Veter. Med. [Praha]*, 29, 1984, s. 699—704.
- NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J.: Vplyv dichlórvosu a metationu na vybrané enzýmy prvoka *Tetrahymena pyriformis*. *Veter. Med. [Praha]*, 30, 1985, s. 443 až 447.
- NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J. — BENEŠ, J.: Vplyv ultrafialového žiarenia na prvoka *Tetrahymena pyriformis*. *Veter. Med. [Praha]*, 28, 1983, s. 443—448.
- NIŠTIAR, F. — HRUŠOVSKÝ, J. — MOJŽIŠ, J. — MIŽIK, P. — NIŠTIAROVÁ, A.: Biologická metóda na stanovenie mykotoxínov — *Tetrahymena pyriformis*. *Veter. Med. [Praha]*, 31, 1986, s. 245—250.
- NIŠTIAR, F. — NIŠTIAROVÁ, A.: Využitie jednobunkových organizmov ako test-objektov v biológii a medicíne. *Fyzika, medicína a biologie, JČSMF, Praha*, 1983, s. 26—40.
- NIŠTIAR, F. — PUZOVÁ, H. — MOJŽIŠ, J. — ĐUROVIČOVÁ, J. — JANIGOVÁ, V. — SIEGFRIED, L. — NIŠTIAROVÁ, A.: Využitie prvoka *Tetrahymena pyriformis* na štúdium faktorov virulencie *Escherichia coli*. *Biológia [Bratislava]*, 45, 1990, s. 943—948.
- WELLS, C.: The response of *Tetrahymena pyriformis* to ionizing radiation: strain specific radiosensitivities. *J. Cell. comp. Physiol.*, 55, 1960, s. 207—215.

Došlo dňa 25. 10. 1990

NIŠTIAR, F. — MIŽIK, P. — REXA, R. — MOJŽIŠ, J. — HRUŠOVSKÝ, J. — IVANKO, Š. — NIŠTIAROVÁ, A. [Faculty of Medicine of P. J. Šafárik University, Košice; Military Veterinary Extension and Research Institute, Košice; Faculty of Science of P. J. Šafárik University, Košice; University of Veterinary Medicine, Košice]: *The effects of gamma-radiation on the W strain of Tetrahymena pyriformis*. *Veter. Med. [Praha]*, 36, 1991 [10]: 633—637.

In the present study the effects of gamma-radiation at doses of 102.1 Gy — 1633.4 Gy were investigated as exerted on the protozoan *Tetrahymena pyriformis* W strain. An investigation of lethality (Tab. I) showed that all irradiated cells survived after the doses of 102.1 Gy and 204.2 Gy. When the doses of 408.4 and 816.7 Gy were applied, 60.6 % and 8.8 %, resp., of irradiated cells survived. Not a cell survived the dose of 1633.4 Gy. The effects of gamma-radiation on the generation time of *Tetrahymena pyriformis* are shown in Tab. II. A markedly longer generation time than in the control was observed if the radiation doses made 408.4 and 816.7 Gy. There were no

significant changes there when the effects of irradiated incubation media on the growth of nonirradiated cells of the W strain of *Tetrahymena pyriformis* were investigated (Tab. III). The results confirmed the relatively high radioresistance of the *Tetrahymena* protozoon with respect to gamma-radiation; this protozoan is a suitable biological model for a study of the effects of various kinds of ionizing radiation at the level of both cell and population.

Tetrahymena pyriformis; gamma-radiation; LD₅₀; generation time

Adresy autorov:

MVDr. František Ništiar, CSc., MVDr. Ján Mojžiš, MVDr. Agnesa Ništiarová, Lekárska fakulta UPJŠ, Trieda SNP 1, 040 66 Košice

Ing. Peter Mižik, Vojenský veterinárny doškolovací a výskumný ústav, B-35, 041 15 Košice

RNDr. Radimír Rexa, CSc., Prírodovedecká fakulta UPJŠ, Moyzesova 11, 041 67 Košice

Prof. ing. Štefan Ivanko, DrSc., Vysoká škola veterinárska, Komenského 71, 040 01 Košice

Prof. MVDr. Jozef Hrušovský, DrSc., Čínská 35, 160 00 Praha 6

POKYNY PRO AUTORY VĚDECKÉHO ČASOPISU VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Časopis Veterinární medicína uveřejňuje původní práce, recenze apod.

Autor je plně odpovědný za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být připojeno prohlášení autora o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu i kvalitě prací.

Je třeba, aby autoři přesně dodržovali tyto pokyny:

Jednotlivé práce nemají mít rozsah větší než 10 až 12 stran psaných na stroji se všemi přílohami. Autoři nechť se vyvarují nadměrného množství tabulek a zařazují raději grafy.

Technická úprava rukopisu

Úprava rukopisu má odpovídat ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, tzn., že mezi řádky se dělají dvojité mezery). Ilustrace, grafy, tabulky a fotografie (černobílé) mají vyhovovat ČSN 88 2109, dodávají se zvlášť a nepodlepují se. Rýsují se tuší na bílý nebo pauzovací papír a popisují se jednotnou velikostí písma (šablona 3,5 mm). Na zadní straně se vyznačí tužkou pořadové číslo obrázku a napíše se jméno autora článku. Texty k obrázkům se dodávají na zvláštním listě, umístění obrázků se označuje na levém okraji příslušné strany rukopisu číslicí v kroužku. Tabulky se číslují římskými číslicemi. Na všechny obrázky i tabulky musí být v textu práce odkazy. Pro překlad do angličtiny je nutné vysvětlit všechny použité zkratky.

Úprava vlastní práce

Název práce (titul) nemá přesahovat 85 úhozů. Je nutné se v názvu vyvarovat obecných frází jako: Studie o..., Příspěvek k..., Pokus o... Každý zaslaný článek musí být samostatnou prací, nemohou být publikovány články na pokračování, označené např.: Studie o... I., II., III. atd., stejně tak jsou vyloučeny podtituly článků.

Jména autorů se uvádějí bez titulů — příjmení a první písmeno jména.

Souhrn

Vypracování souhrnu je nutné věnovat obzvláštní péči. Autor do něho má shrnovat vše, co je na jeho práci pozoruhodné

a nové a co má být dokumentováno. Souhrn má být nekritickým informačním výběrem významného obsahu a závěru, nikoliv však jeho pouhým popisem. Musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo ve vědecké práci, nemá ji však nahradit. Nesmí překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl psán celými větami, nikoliv telegrafickým způsobem. Pro překlad do angličtiny se požaduje souhrn delší (do dvou rukopisných stran) s odkazy na tabulky a obrázky, popř. s anglickými odbornými termíny nebo už přeložený do angličtiny. Souhrn začíná jménem autorů, názvem pracoviště a jeho sídlem (v závorce), titulem článku a citací: Veter. Med. (Praha), 00, 1990. Místa označená nulami doplní na kompletní citaci při korektuře redakce.

Clíčová slova (Key words, index terms)

Pod souhrn je nutno po vynechání řádky připojit klíčová slova. Ta mají sloužit:

- a) k rychlé orientaci (jakýsi „zkrácený referát“);
- b) při zařazování práce do kartotéky.

Klíčových slov by nemělo být méně než 3 a více než 12. Začínají malým písmenem a oddělují se středníkem.

Úvod

Úvod má obsahovat hlavní důvody, proč byla práce uskutečněna, a velmi stručnou formou stav studované otázky. Je nutné se v něm vyhnout rozsáhlým historickým přehledům. Uvádí se bez nadpisu, je možné v něm uvést k práci se vztahující citaci autorů (doporučuje se co nejnížší počet citací — čtyři až osm autorů).

Materiál a metody

Metody se popisují pouze tehdy, jsou-li původní, jinak postačuje citovat autora metod a uvádět jen případné odchylky. Je v nich popsán pokusný materiál. Popis metod by měl umožnit, aby kdokoliv z odborníků mohl podle něho a při použití uvedených citací práci opakovat.

Výsledky

Doporučuje se nepoužívat k vyjádření kvantitativních stavů tabulek a dát přednost grafům nebo tabulky shrnout ve statistickém hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

Diskuse

Diskuse obsahuje zhodnocení práce. Diskutuje se o možných nedostatcích a práce se konfrontuje s výsledky dříve publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, kteří mají k publikované práci bližší vztah), pokud mají souvislost, nebo pokud jsou s předloženou prací nějak srovnatelné.

Poděkování

Je-li to nutné, uvádí se stručné poděkování (jedna až dvě věty), např.: za technickou spolupráci, za pomoc při statistickém zpracování a poskytnutí méně běžného léčiva apod.

Literatura

V textu se při citaci uvede jméno autora a rok publikování. Do seznamu se zařadí všechny práce citované v textu článku, a to podle abecedy, bez číslování, každá citace na novém řádku. Je-li více prací od téhož autora ve stejném roce, přidá se k letopočtu označení a, b, c.

Literatura musí odpovídat ČSN 01 0197.

Zkratky názvů časopisů je třeba dodržovat podle publikace doc. Bojnanského a kol., vydané v roce 1982 Slovenskou akadémiou vied pod názvom Períodiká z oblasti biologicko-poľnohospodárskych vied, ich citácie a skratky.

Adresa autora

Na zvláštním listě uvede autor akademický titul, jméno (ne jen zkratku), příjmení, vědeckou hodnost a podrobnou adresu pracoviště s PSČ. Totéž uvede i pro spoluautory.



**CHCETE PODNIKAT
A NEVÍTE JAK NA TO?
NEVÍTE S KÝM,
NEVÍTE ZA CO,
PŘIJĎTE — JE TU
ADEKO!!!**

ADEKO, a. s., Vám nabízí

- **marketingovou činnost v oboru ekologie**
- **poradenskou, konzultační, posudkovou, zprostředkovatelskou, obstaravatelskou a zastupitelskou činnost**
- **kapitálovou účast v jiných podnikatelských společnostech**
- **společné podnikání**
- **investorskou a investiční činnost**
- **výběr zahraničních partnerů pro společné podnikání**
- **zajišťování a provádění leasingu**
- **poskytování služeb**

ADEKO, a. s.

Slezská 7

120 56 PRAHA 2

Telefon: 25 83 42

Fax: 25 92 70



Rukopisy odevzdány k tisku 13. 9. 1991 — Podepsáno k tisku 18. 12. 1991

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA • Vydává Československá akademie zemědělská — Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství • Vychází měsíčně • Redaktorka ing. Zdeňka Radošová • Redakce: 120 56 Praha 2, Slezská 7, telefon 25 75 41 • Vytiskly OSTRAVSKÉ TISKÁRNĚ, s. p., provoz 21, Ostrava 1, Novinářská 7
© Ústav vědeckotechnických informací pro zemědělství, Praha 1991

Rozšiřuje PNS. Informace o předplatném podá a objednávky přijímá každá administrace PNS, pošta, doručovatel a PNS—ÚED Praha, ACT, Kafkova 19, 160 00 Praha 6; PNS—ÚED Praha, závod 02, Obránců míru 2, 657 07 Brno; PNS—ÚED Praha, závod 03, 28. října 206, 709 90 Ostrava 9.