

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH
INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

12

ČÍSLO 38 (LXVI)
PRAHA 1993
ISSN 0375-8427

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD
SLOVENSKÁ AKADEMIA PÔDOHOSPODÁRSKYCH VIED

The journal publishes experimental papers and reviews from all spheres of veterinary medicine

The contents of all editions and paper summaries are covered by Current Contents - Agriculture, Biology and Environmental Sciences

Editorial Board - Redakční rada

Prof. MVDr. Jan B o u d a , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír H o f í r e k , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Karel H r u š k a , CSc., (Chairman), Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Gabriel K o v á ě , DrSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Doc. MVDr. Imrich M a r a ě e k , DrSc., Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Zdeněk P o s p í š i l , DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan R o s i v a l , CSc., University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

Prof. MVDr. Bohumil Š e v ě í k , DrSc., Research Institute of Feed Supplements and Veterinary Drugs, Jílové u Prahy, Czech Republic

Editor in Chief - Vedoucí redaktorka

Ing. Zdenka Radošová

PATOLOGIE A DIFERENCIÁLNÍ DIAGNOSTIKA ONEMOCNĚNÍ MAEDI-VISNA

R. Halouzka, V. Celer

Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Brno

U 38 ovcí sérologicky pozitivních na onemocnění Maedi-Visna byla zjišťována intenzita a distribuce charakteristických lézí v orgánech a tkáních. Změny v plicích, mléčné žláze, CNS a kloubech byly hodnoceny křížky. Nejčastěji byly postiženy plíce, mléčná žláza a CNS. V 57 % případů byla pozorována konkurentní incidence plicní adenomatózy. V práci je diskutována diferenciální diagnostika charakteristických M-V lézí a plicní adenomatózy. Identifikace osmi případů meningoencefalitidy, která je považována za iniciační stadium formy Visna je prioritním pozorováním v České republice. Vzhledem k rozšíření nositelů lentiviru autoři zdůrazňují nutnost podrobného patomorfologického vyšetření vyřazovaných ovcí.

ovce; Maedi-Visna; patologie; konkurentní léze; diferenciální diagnostika

Základním patogenetickým mechanismem onemocnění Maedi-Visna u ovcí je lentivirová infekce specifických populací makrofágů. Mechanismy řídící expresi virových genů v těchto buňkách jsou většinou neznámé a pouze některé byly objasněny.

Bylo prokázáno, že maturace latentně infikovaných prekurzorů makrofágů - monocytů indukuje expresi virových genů (G e n d e l m a n aj., 1986) a imunitní aktivace infikovaných makrofágů snižuje produkci lentivirových partikul (Z i n k a N a r a y a n , 1989). Lokalizace patologických změn ve tkáních je dána selektivní expresí virového genu v rozdílných populacích makrofágů v závislosti na vzájemném vztahu lentiviru a hostitele. Intenzita patologických změn je však určována stupněm virové replikace v těchto populacích makrofágů (N a r a y a n , 1990).

Pro determinaci charakteru morfologických lézí při infekci virem Maedi-Visna má hlavní význam perzistentní nízký stupeň infekce makrofágů: Ty exprimují neustále na svém povrchu lentivirové antigeny a předkládají je T-lymfocytům; následuje kaskáda buněčných reakcí rezultujících v proliferaci mononukleárních buněk. Vzniká tak chronická, aktivní zánětlivá reakce s lymfoidní infiltrací a proliferací v jednom nebo více orgánových systémech (K e n n e d y aj., 1985).

Virus M-V vyvolává u ovcí onemocnění dýchacího (Maedi), nervového (Visna) a pohybového systému a mastitidu. Za orgánově-specifické léze jsou považovány hyperplazie hladkosvalových elementů v plicích, demyelinizace v CNS, fibróza mléčné žlázy, proliferace synoviální membrány a degenerace kloubních chrupavek (G u d n a d o t t i r , 1974; C u t l i p aj., 1985).

Obtížná morfologická diagnostika a interpretace patologického nálezu je dána komplikovanou patogenezí vlastního onemocnění a častými komplikujícími lézemi vyvolanými jinými infekčními agens a zejména tím, že morfologické léze v orgánech nejsou patognomické pro onemocnění Maedi-Visna (M-V).

Předložená práce navazuje metodicky na naše předcházející sdělení (H a l o u z k a a C e l e r, 1993). Jejím účelem je popsat formální patogenezi a detailní morfologické změny při onemocnění M-V a vzhledem k závažnosti této problematiky pojednat o diferenciální diagnostice simultánně se vyskytujících procesů a tak přispět k rozšíření znalostí o patologii tohoto onemocnění v našich podmínkách.

MATERIÁL A METODY

Předmětem patomorfologického vyšetřování byly orgány 38 utracených ovcí plemene merino o průměrném věku 4,5 roku, které jevíly pozitivní sérologickou reakci proti viru Maedi-Visna. Metody sérologického vyšetření, odběr vzorků orgánů, fixace, barvení a další zpracování jsou posány v předcházejícím sdělení (H a l o u z k a a C e l e r, 1993). Stupeň pozorovaných charakteristických histopatologických M-V změn v orgánech jsme hodnotili křížky (G e o r g s s o n a P a l s s o n, 1971; C u t l i p a j., 1985; D a w s o n, 1987).

PLÍCE

Stupeň hodnocení odpovídal při difúzním postižení plicních laloků makroskopicky nejvýraznějším změnám a u fokálních a konfluujících lézí obvykle centru změn.

- bez morfologických změn;
- + dilatace interalveolárních kapilár, perivaskulární lymfoidní infiltrace, mírná mononukleární infiltrace v interalveolárních septech a hypertrofie hladkosvalových buněk ve stěně terminálních bronchiolů a alveolárních duktů;
- ++ denzní interalveolární lymfoidní a makrofágová infiltrace, zesílení interalveolárních sept, hyperplazie hladkosvalových buněk přecházející na přilehlá septa, perivaskulární, peribronchiální a peribronchiolární lymfocytární infiltrace;
- +++ výrazné zesílení interalveolárních sept, parciální kubická metaplasie alveolární výstelky, perivaskulární a peribronchiální lymfoidní infiltrace, tvorba zárodečných center v lymfatických nodulech, perinodulární až difúzní fibróza, atelektázy.

MLÉČNÁ ŽLÁZA

- bez morfologických změn;
- + mononukleární infiltrace acinů a periduktální tkáň;
- ++ výrazná lymfocytární a makrofágová infiltrace acinů, atrofie acinů, periduktální fibróza s výraznou periduktální a submukózní lymfoidní infiltrací;
- +++ tvorba zárodečných center v periduktálních lymfatických nodulech, fibróza mléčné žlázy se známkami sklerotizace.

CNS

- bez morfologických změn;
- + lymfocytární leptomeningitida, lymfoidní infiltrace chorioidálního plexu mozkových komor, subependymální edém, hyperemie a ojedinělé hemoragie, výrazné paraventrikulární perivaskulární lymfoidní infiltrace, mírná glióza;
- ++ výrazná paraventrikulární glióza, sporadické perivaskulární lymfoidní infiltrace, iniciální demyelinizace v gliových ložiscích.

KLOUBY

- bez morfologických změn;
- + proliferativní synovitis s mírnou lymfoidní infiltrací.

VÝSLEDKY

Změny charakteristické pro onemocnění Maedi-Visna jsme pozorovali v orgánech a tkáních 33 ovcí (tab. I). Počty ovcí s distribucí charakteristických změn v jednotlivých orgánech a tkáních uvádí tab. II.

PLÍCE

Známky nekomplikované progresivní chronické intersticiální pneumonie jsme diagnostikovali u 9 ovcí, komplikaci jinými patologickými procesy jsme pozorovali u 12 ovcí.

U 11 ovcí, u kterých jsme plicní změny histologicky hodnotili +, byly plíce kolabované bez makroskopických změn nebo částečně kolabované s různě velkými oblastmi šedorůžového zabarvení nepatrně tužší konzistence na dorsolaterální ploše kaudálních laloků. Mízní uzliny mediastinální byly mírně zvětšené a na řezu vlhčí.

Progresi patologického procesu jsme pozorovali u šesti ovcí (++) . Nekolabované zvětšené plíce s velkými ložisky světlé šedomodré barvy a zesílenou pleurou byly tuhé konzistence a větší hmotnosti. Při detailnější adspekci měly v některých případech retikulární vzhled.

V pokročilých případech (čtyři ovce +++), byla postižená oblast plic homogenní šedé barvy, konsolidována a v závislosti na stupni konfluency lézí, tuhé gumovité konzistence. Řezná plocha byla většinou suchá. U nejvíce pokročilých změn byly postiženy i kraniální laloky. U dvou ovcí jsme v kraniálních lalocích pozorovali ložiska nepravidelného tvaru, červenohnědé barvy ostře kontrastující s nezměněnou plicní tkání, zatímco při jejich lokalizaci v šedě zbarvené tkáni byly jejich okraje neostře a přecházely do šedorůžové barvy. Histologickým korelátem byla chronická hnisavá ložiska a granulomatózní pneumonie. Korepondující mízní uzliny byly nápadně zvětšené, na řezu s výraznou hyperplazií kory. Histologickým vyšetřením jsme diagnostikovali reaktivní hyperplazii.

Ve dvou případech byly charakteristické M-V změny komplikovány mírným katarálně-hnisavým zánětem.

I. Intenzita M-V charakteristických lézí v orgánech vyšetřených ovcí – The intensity of Maedi-Visna virus induced typical lesions in the organs of examined sheep

Ovce č. ¹	Plíce ²	Mléčná žláza ³	CNS	Kloub ⁴
1	+++	++	-	-
2	+++	++	-	+
3	+++	++	+	N
4	+++	-	+	N
5	++	-	+	-
6	++	N	-	N
7	++	N	-	N
8	++	N	-	N
9	++	N	-	N
10	++	N	N	-
11	+	-	-	-
12	+	-	-	N
13	+	++	-	N
14	+	++	-	N
15	+	N	-	N
16	+	-	+	-
17	+	+	-	-
18	+	++	-	-
19	+	-	N	-
20	+	N	++	-
21	+	N	-	-
22	-	+++	-	-
23	-	+++	-	-
24	-	+++	N	-
25	-	++	N	-
26	-	++	++	-
27	-	++	N	N
28	-	++	N	-
29	-	++	N	-
30	-	++	N	N
31	-	+	-	N

Ovce č. ¹	Plíce ²	Mléčná žláza ³	CNS	Kloub ⁴
32	-	-	++	-
33	-	-	++	N
34	-	N	-	-
35	-	-	-	-
36	-	-	N	N
37	-	-	-	N
38	-	-	-	N
Celkem ⁵	21	17	8	1

¹sheep no., ²lungs, ³mammary gland, ⁴joint, ⁵total

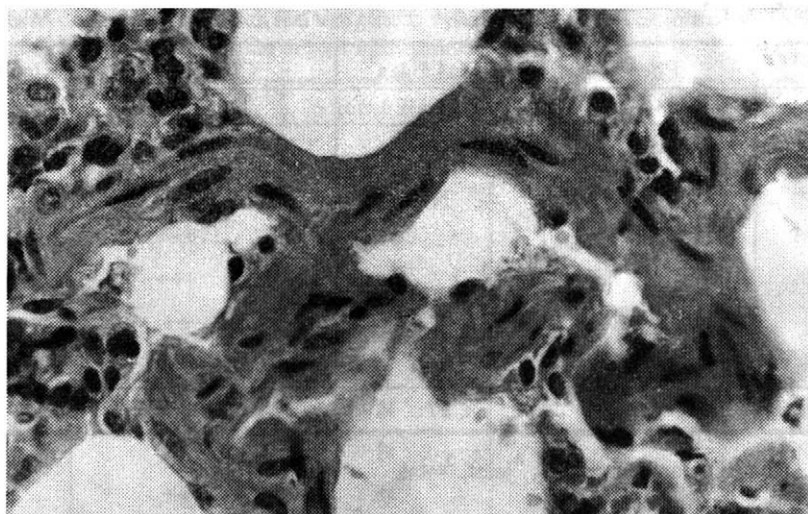
N = neprováděno – not performed

II. Distribuce M-V změn v orgánech a tkáních vyšetřených ovcí – Distribution of M-V lesions in the organs and tissues of examined sheep

Plíce ¹	10
Plíce a mléčná žláza ²	5
Plíce a CNS ³	4
Plíce, mléčná žláza a CNS ⁴	1
Plíce, mléčná žláza a kloub ⁵	1
Mléčná žláza ⁶	9
Mléčná žláza a CNS ⁷	1
CNS	2

¹lungs; ²lungs and mammary gland; ³lungs and CNS; ⁴lungs mammary gland and CNS; ⁵lungs, mammary gland and joint; ⁶mammary gland; ⁷mammary gland and CNS

Při histologickém vyšetření jsme kromě M-V charakteristických změn pozorovali u šesti ovcí odlišné, různě velké, multipní, fokální, léze. Byly charakterizovány proliferací kubických nebo cylindrických bazofilních buněk výstelky alveolů a terminálních bronchiolů a vytvářely papilární výběžky do lumina. V místech výrazného zesílení interalveolárních sept mononukleárním infiltrátem a hyperplastickými hladkosvalovými buňkami vytvářely hnízda hustě nahloučených buněk, ne nepodobných dlaždicovitým epitelím. Známky hlenové sekrece a přítomnost makrofágů v některých luminech nebyly vzácným jevem. Na periférii těchto



1. Maedi-Visna. Hypertrofie a hyperplazie hladkosvalových buněk v terminálním alveolu a alveolárních duktech plic; HE, 10 x 40 – Maedi-Visna. Hypertrophy and hyperplasia of smooth-muscle cells in a terminal alveole and in alveolar ducts of lungs; HE, 10 x 40

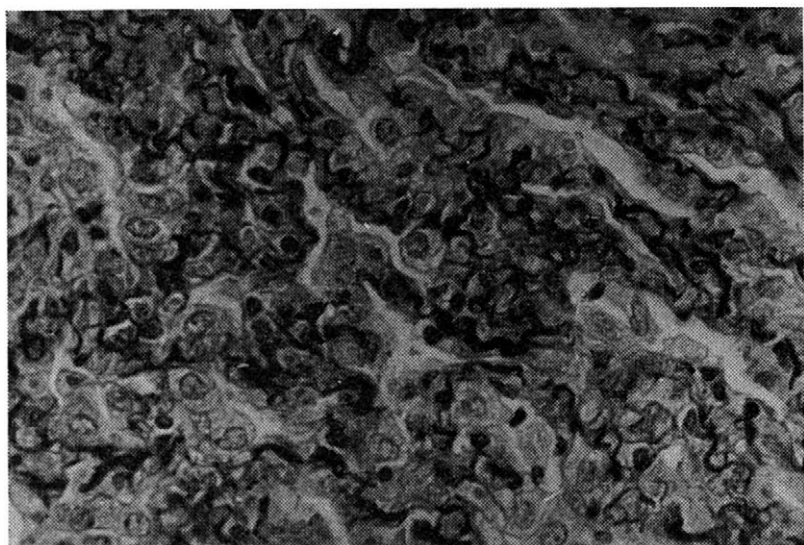
ložisek byla četná makrofágová infiltrace. U dvou ovcí byla lumina i periferie nádorových uzlů infiltrována granulocyty.

Rozdílný makroskopický a mikroskopický obraz plic jsme pozorovali u jedné ovce. Plíce byly kolabované, na povrchu nezměněné. Na řezné ploše v hloubce plicního parenchymu kaudálního laloku jsme pozorovali několik lobulárně uspořádaných šedých ložisek konzolidované tkáně nepravidelného tvaru, o průměru 1 až 2 cm. Mikroskopicky odpovídaly charakteru bronchioloalveolárního adenomu s periferním alveolárním emfyzemem a četnými makrofágy s vakuolizovanou cytoplazmou. M-V změny jsme nepozorovali. U dvou ovcí s makroskopicky negativním nálezem jsme zjistili identické změny postihující pouze několik alveol. Regionální mízní uzliny nebyly alterovány.

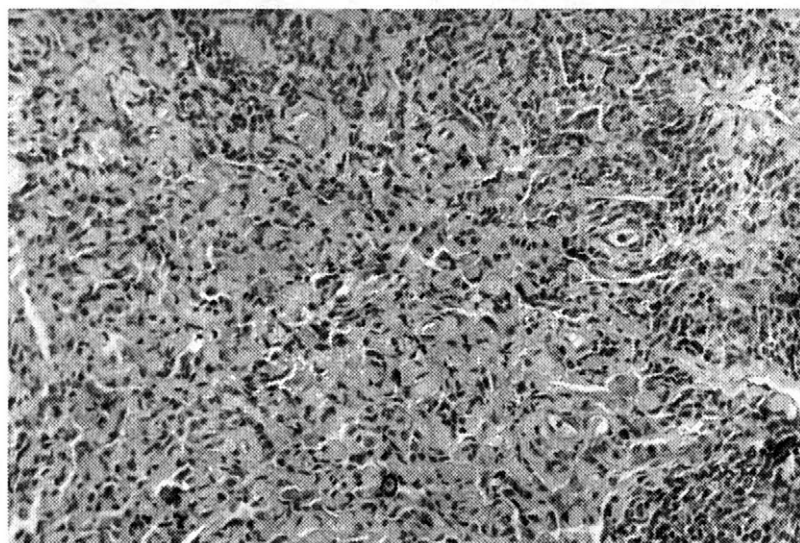
MLÉČNÁ ŽLÁZA

Mléčné žlázy dvou ovcí, s histologickým nálezem +, byly atrofované, palpačně a na řezu nezměněny. U 12 (++) a u tří (+++) ovcí byly atrofované mléčné žlázy difúzně tuhé konzistence a barvou splývaly s okolní tukovou tkání. Při histologickém vyšetření byly nápadné zbytky kondenzovaného a mineralizovaného mléčného sekretu. U jedné ovce jsme pozorovali ve fibrózně změněné mléčné žláze ložisko chronického hnisavého zánětu. Mízní uzliny supramamární byly v případech hodnocených +++ atrofické a histologicky jevíly známky chronické indurativní lymfadenitidy. V ostatních případech nebyly změněny.

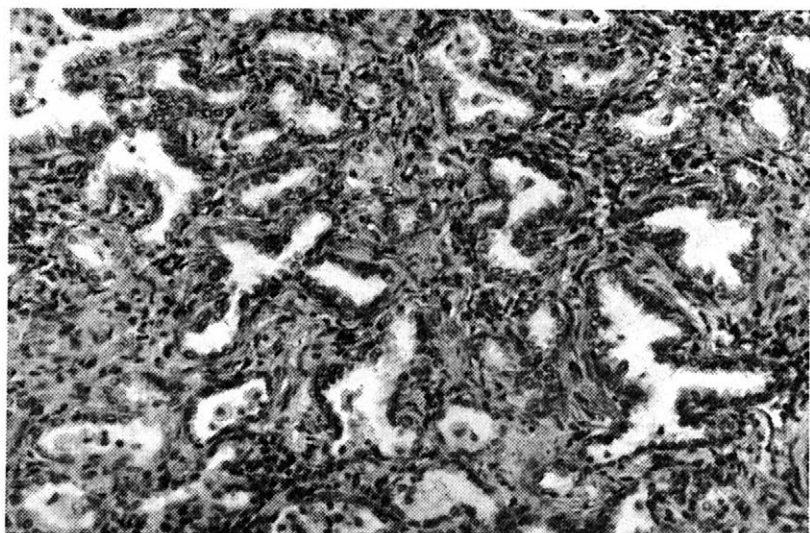
U 12 ovcí byly mléčné žlázy atrofické, bez známek buněčné infiltrace a zvýšené fibroprodukce.



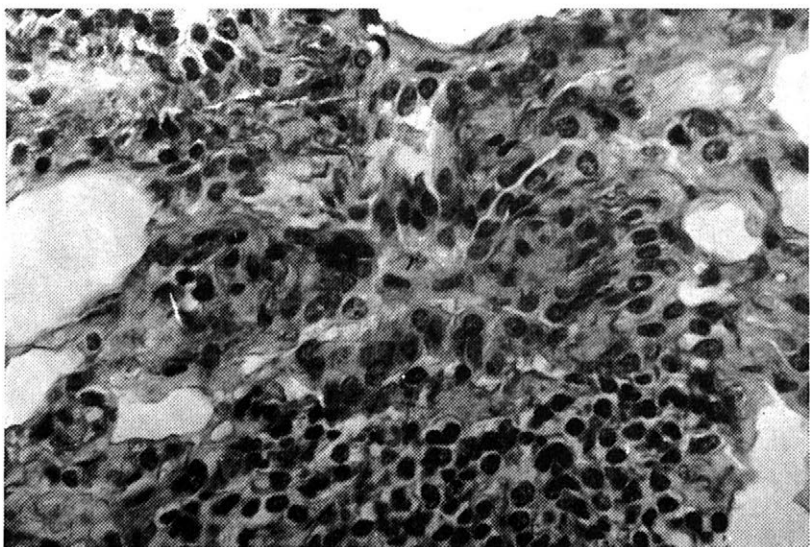
2. Maedi-Visna. Kubická metaplazie epiteliálních buněk výstelky a zesílení bazálních membrán alveolů plic; VG, 10 x 40 – Maedi-Visna. Cubic metaplasia of epithelial cells and thickening of basal membranes of alveoles of lungs; VG, 10 x 40



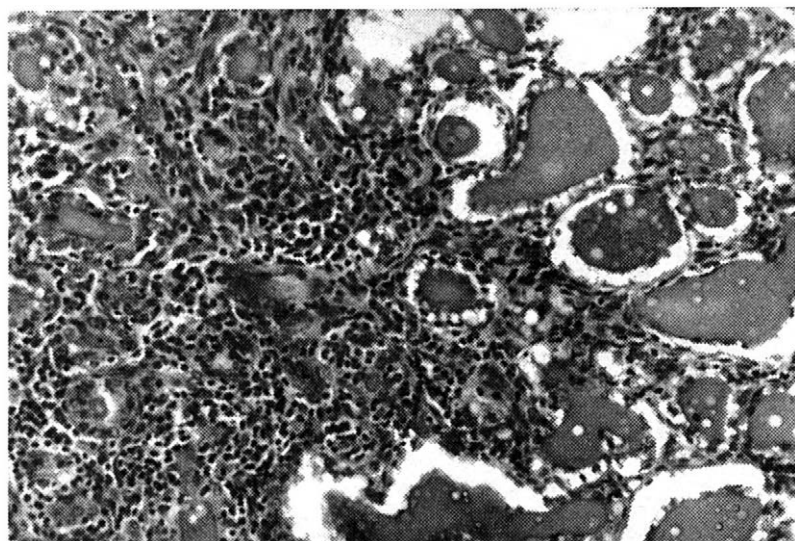
3. Maedi-Visna. Chronická intersticiální pneumonie, kubická metaplazie výstelky a fibróza plic; HE, 10 x 16 – Maedi-Visna. Chronic interstitial pneumonia, cubic metaplasia of epithelium and fibrosis of lung; HE, 10 x 16



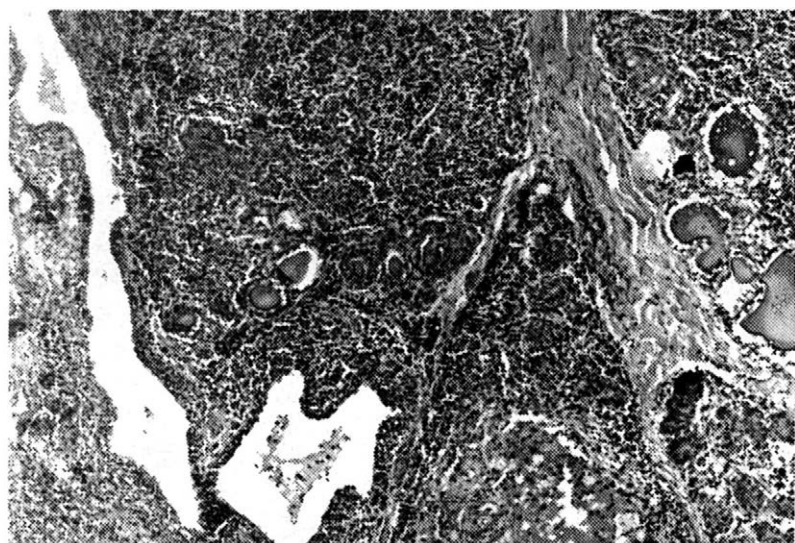
4. Adenomatóza plic. Fibroprodukce a tvorba nádorového stroma; HE, 10 x 16 – Pulmonary adenomatosis. Fibroproduction and formation of tumorous stroma; HE, 10 x 16



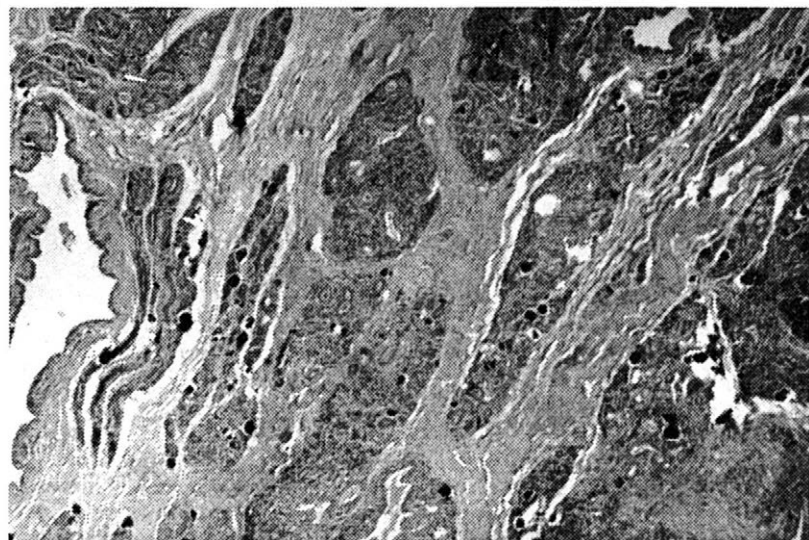
5. Maedi-Visna a adenomatóza plic. Iniciální stadium proliferace epiteliální výstelky a intersticiální pneumonie; HE, 10 x 40 – Maedi-Visna and pulmonary adenomatosis. Initial stage of epithelial proliferation and interstitial pneumonia; HE, 10 x 40



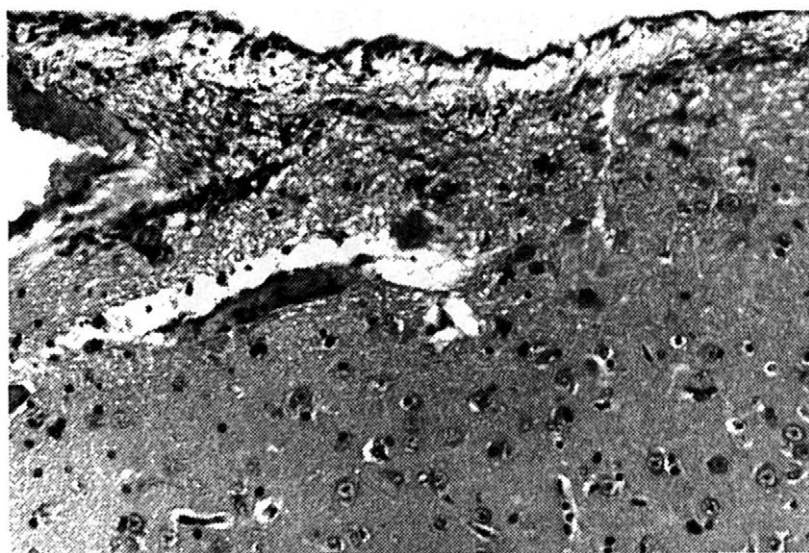
6. Lymfocytární a makrofágová infiltrace interacinární tkáně mléčné žlázy; HE, 10 x 16 – Lymphocytic and macrophage infiltration of the interacinous tissue of mammary gland; HE, 10 x 16



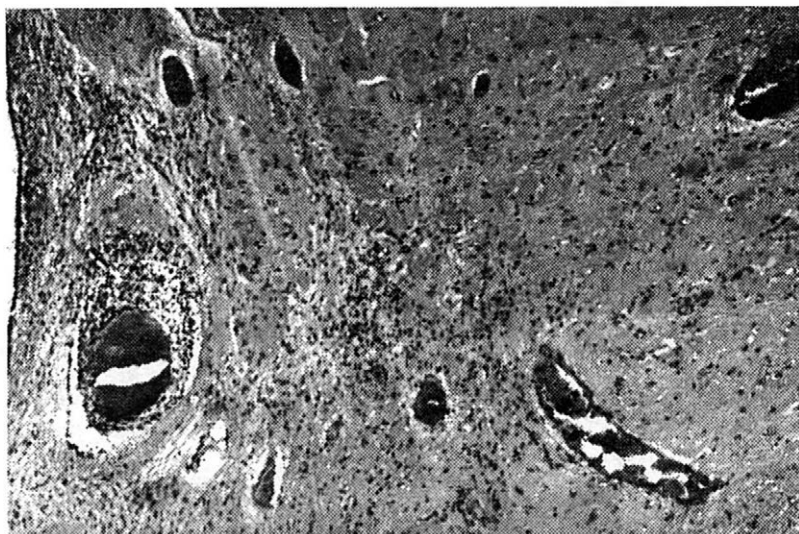
7. Výrazná interacinární a periduktální lymfocytární infiltrace v mléčné žláze; HE, 10 x 6,3 – Conspicuous interacinous and periductal lymphocytic infiltration in the mammary gland; HE, 10 x 6.3



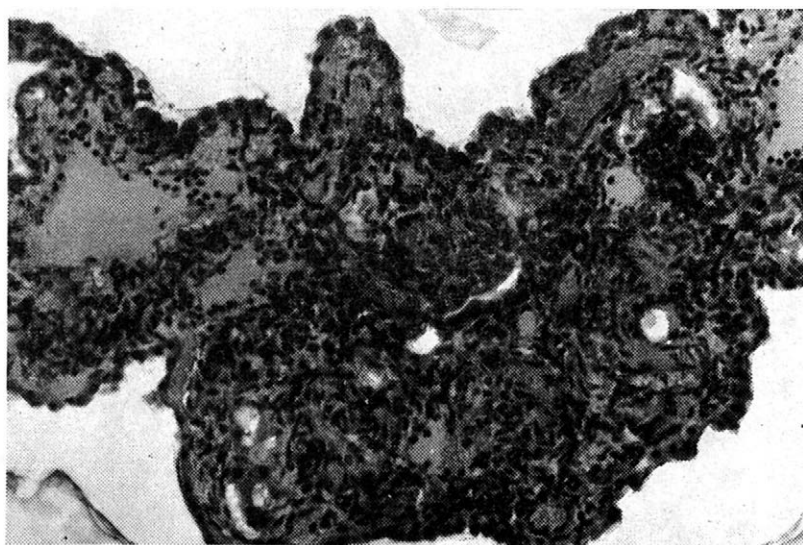
8. Chronická lymfocytární, indurativní mastitida. Četné mléčné konkrementy; HE, 10 x 2,5 – Chronic lymphocytic, indurative mastitis. Numerous milk concretions; HE, 10 x 2.5



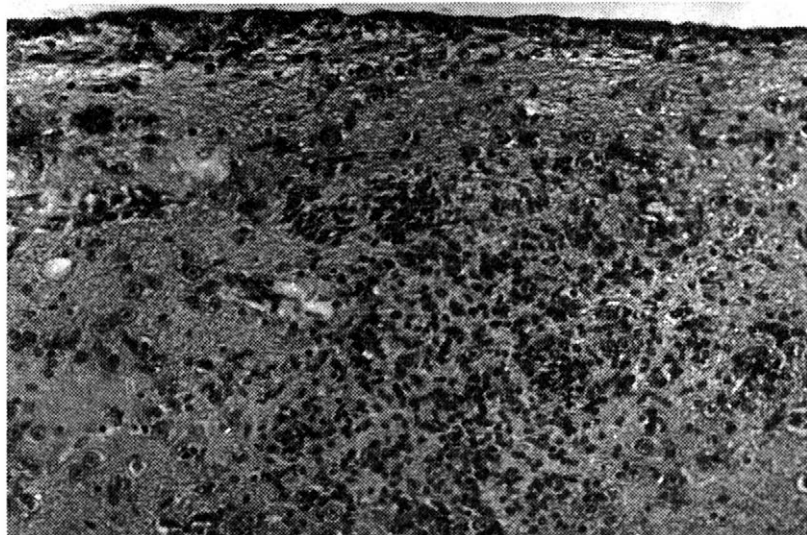
9. Subependymální edém, periventrikulární hyperemie a hemoragie (laterální mozková komora); HE, 10 x 16 – Subependymal edema, periventricular hyperemia and hemorrhage (lateral cerebral ventricle); HE, 10 x 16



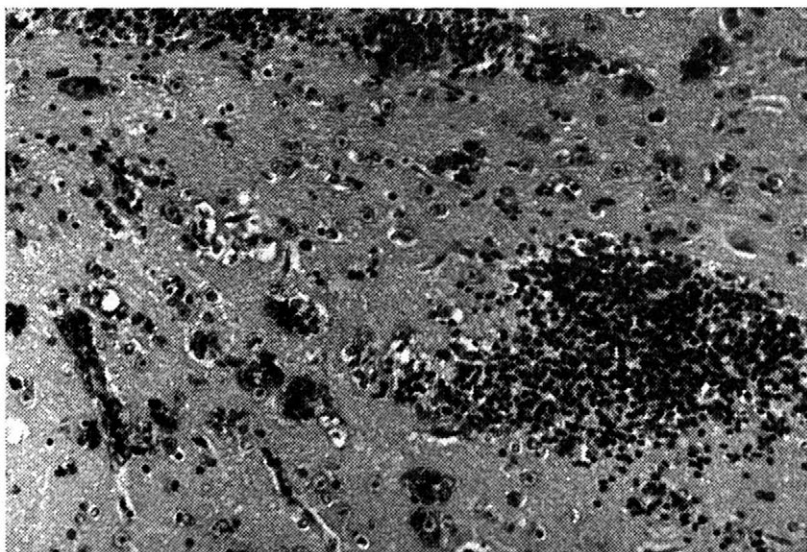
10. Perivaskulární infiltrace, kongesce a iniciální glióza (III. mozková komora); HE, 10 x 2,5 –
Perivascular infiltration, congestion and initial gliosis (IIIrd cerebral ventricle); HE, 10 x 2.5



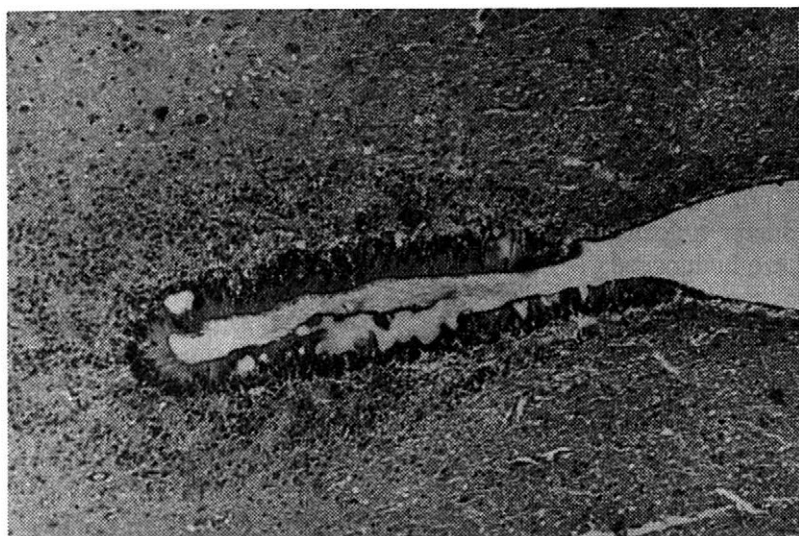
11. Lymfocytární a makrofágová infiltrace v plexus chorioideus laterální mozkové komory; HE, 10 x 40 –
Lymphocytic and macrophage infiltration in the plexus chorioideus of the lateral cerebral ventricle; HE, 10 x 40



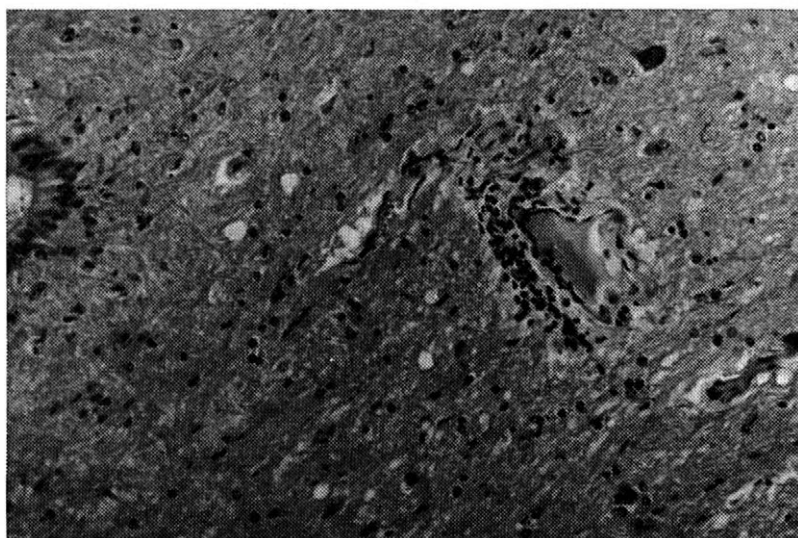
12. Paraventrikulární glióza III. mozkové komory; HE, 10 x 16 – Paraventricular gliosis of the IIIrd cerebral ventricle; HE, 10 x 16



13. Paraventrikulární glióza s převahou oligodendroglie v bílé hmotě rostrálního kolikulu *corpora quadrigemina*; HE, 10 x 16 – Paraventricular gliosis with prevalence of oligodendroglia in the white matter of rostral colliculus of the *corpora quadrigemina*; HE, 10 x 16



14. Paraduktální glióza *aqueductus Sylvii* a iniciální demyelinizace; HE, 10 x 2,5 – Paracanal gliosis of the *aqueductus Sylvii* and inchoate demyelination; HE, 10 x 2.5



15. Perivaskulární lymfocytární infiltrace v dorsálním rohu míšním na úrovni L¹; HE, 10 x 16 – Perivascular lymphocytic infiltration in the dorsal gray column at level L¹; HE, 10 x 16

Histopatologické léze jsme pozorovali u osmi ovčů ve všech transversálních řezech mozku, vedených těsně před *chiasma f. opticorum*, až po řez na úrovni rostrálního cerebelárního pedunkulu. Postihovaly bílou hmotu těsně pod ependymem (+) laterálních mozkových komor, III. mozkové komory a *aquaeductus Sylvii*. U čtyř ovčů jsme pozorovali nehnisavou leptomeningitidu na dorzolaterální ploše mozkových hemisfér a lymfoidní infiltraci *plexus chorioideus* laterálních mozkových komor. Léze hodnocené (++) (4 ovce) jsme pozorovali zejména kolem zadních výběžků postranních komor a přední části *aquaeductus Sylvii*, odkud se šířily do hloubky bílé hmoty. Převažovaly shluky oligodendroglií s příměsí astrocytů a lymfocytů s iniciální demyelinizací. Sporadické perivaskulární lymfoidní infiltráty v dorzálním rohu mšním jsme zjistili pouze u jedné ovce (++) na úrovni L¹. Znamky poškození neuronů jsme nepozorovali.

Mízní uzliny retrofaryngeální byly zvětšeny se známkami reaktivní hyperplazie.

KLOUB

Synoviální membrána kolenního kloubu byla zhrublá a mikroskopicky jsme pozorovali chronickou proliferativní synovitidu s mírnou lymfocytární infiltrací.

DISKUSE

Z výsledků patomorfologické studie vyplynulo, že námi diagnostikované změny a jejich progres v orgánech ovčů pozitivních na přítomnost protilátek proti viru Maedi-Visna odpovídají uváděné kauzální a formální patogenetice pomalých viróz (Narayan, 1990) a jsou zcela v souladu s popisy jiných autorů (Georgsson a Palsson, 1971; Cutlip aj., 1985; Dawson, 1987; Watt aj., 1992). Jejich morfologický vzhled a progres reflektuje aktivní chronický průběh onemocnění s následnou specifickou tkáňovou alterací, která je dána její histologickou strukturou a funkcí.

Postižení jednotlivých orgánů a simultánní incidence M-V charakteristických změn ve více orgánech a tkáních jsou důsledkem systémové infekce a složitého biologického vztahu lentiviru a hostitele. Progresivní intersticiální pneumonie (Maedi) je v infikovaných chovech diagnostikována častěji, zatímco nehnisavá meningoencefalitida (Visna) je diagnostikována vzácně, zřejmě z důvodů větší náročnosti diagnostických přístupů a metod (Dawson, 1987; Watt aj., 1992). Zvoleným metodickým postupem (Halouzka a Celer, 1993) jsme diagnostikovali formu Visna u osmi ovčů (27,3 %) a tento stupeň incidence je v souladu s pozorováním i jiných autorů (Watt aj., 1992).

I u sérologicky pozitivních zvířat není snadné diagnostikovat onemocnění M-V na základě identifikace charakteristických změn v jednotlivých orgánech, protože nejsou patognomické (Cutlip aj., 1985). Z hlediska diferenciální diagnostiky je třeba brát v úvahu etiologicky a patogeneticky jiné patologické procesy.

Ložisková hypertrofie a hyperplazie hladkosvalových buněk v plicích může být důsledkem ischemických a obstrukčních plicních změn patogeneticky odlišných.

Podobné změny se pozorují také při chronických pneumoniích jiné etiologie. Lymfofolikulární hyperplazie a intersticiální pneumonie může být způsobena jinými virovými a chlamydiovými infekcemi (J u b b aj., 1985). Charakteristická pro onemocnění M-V je však vzájemná kombinace všech popsaných lézí a jejich distribuce v plicních lalocích. U etiologicky odlišných pneumonií (mykoplazmové, bakteriální, virové) bývají postiženy převážně ventrální části kraniálních laloků anebo většinou dorzální části kaudálních laloků (parazitě). Proto je důležité vyšetřit všechny plicní laloky.

Pozorované výrazné lymfatické noduly podél vývodného systému mléčné žlázy a různý stupeň difuzní lymfoidní infiltrace jsou sice velmi průkazné a charakteristické pro infekci virem M-V, ale zjišťují se i u jiných chronických mastitid. V některých částech histologických řezů připomínaly i maligní lymfom, jehož konkurentní incidence s onemocněním M-V byla již posána (D i G u a r d o aj., 1992).

Klinický význam zjištěných lézí v CNS nemůžeme posoudit. V literatuře uváděnou výraznou demyelinizaci v pokročilých stadiích onemocnění (S i g u r d s s o n aj., 1957; P e t u r s s o n, 1976) jsme nepozorovali. Iniciální změny však nemusí být doprovázeny výraznou klinickou symptomatologií (W a t t aj., 1992). Identifikovaná meningoencefalitida nepřipomínala žádné onemocnění vyskytující se v našich podmínkách. Uvádí se, že se vyskytuje samostatně nebo společně s pneumonií (C u t l i p aj., 1979). Distribuce lézí postihující v podstatě bílou hmotu mozkovou byla odlišná od lézí způsobených neurotropními viry, toxiny i karencními vlivy. Patogeneze změn v CNS je nejasná a zatím neexistuje vysvětlení pro periventrikulární distribuci iniciálních lézí. Z našich pozorování vyplynulo, že pro detekci změn v CNS je třeba odebrat vzorky tkáně zejména z okolí mozkových dutin.

Změny v kloubech jsou v nejnovější literatuře popisovány jako součást infekce virem M-V (C u t l i p aj., 1985) i když jsou významnější u retrovirové infekce koz (P e r r i n, 1989). Pozitivní diagnóza synovitid a artritid při častých zánětlivých procesech paznehtů může uniknout.

Značné problémy při diagnostice onemocnění M-V vznikají při častých souběžných infekcích jinými agens. V našem souboru jsme pozorovali časté simultánní změny specifické pro plicní adenomatózu (M a r k s o n a T e r l e c k i, 1964; C u t l i p a Y o u n g, 1982; J u b b aj., 1985). Existují názory, že konkurentní incidence plicní adenomatózy v chovu může být příčinou rychlého šíření infekce lentivirem M-V mezi zvířaty (P r i t c h a r d a D o n e, 1990). G o n z á l e z aj. (1993) uvádí, že plicní adenomatóza hraje určitou roli v šíření lentivirové M-V infekce, ale k synergickému účinku simultánní infekce na expresi konkurentních lézí zřejmě nedochází. Jsme toho názoru, že k šíření viru M-V v našich chovech přispěla zejména absence detekce séropozitivních zvířat.

Makroskopická diferenciální diagnostika je v těchto případech nesnadná. Uvádí se tendence k tvorbě fokálních lézí u plicní adenomatózy a difuzní postižení plic při onemocnění M-V (L a i r m o r e aj., 1988; P r i t c h a r d a D o n e, 1990), což při konkurentním výskytu nemá význam jak vyplynulo z našeho pozorování. Nápadným jevem u adenomatózy je však multipní, fokální hyperplazie a proliferace

epiteliálních buněk výstelky alveolů a terminálních bronchiolů. V pokročilých případech je ale tento jev poněkud zastřen fibroplazií a vytvářením nádorového stroma (Cutlip a Young, 1982). K částečné nebo i kompletní metaplazii epitheliálních buněk u M-V dochází, obvykle však v okolí lymfatických nodulů a tento jev je nenápadný. V pokročilých případech M-V jsme pozorovali i výraznou difúzní fibrózu plic s kubickou metaplazií výstelky, ale bez známek proliferace, což považujeme za běžný jev při chronických pneumoniích. Léze vyvolané běžnými bakteriálními patogeny a parazity v plicích mají zcela odlišný charakter a je snadné je histologicky odlišit.

Závěrem konstatujeme, že i když naše vyšetření nezahrnovala virologické, bakteriologické a parazitologické metody nezbytné pro stanovení objektivní a definitivní diagnózy pozorovaných změn, vzhledem k morfologickému charakteru, distribuci lézí v jednotlivých orgánech a pozitivnímu průkazu protilátek, je diagnóza onemocnění Maedi-Visna správná. Zjištěnou meningoencefalitidu považujeme za iniciální stadium formy Visna, která je prioritním pozorováním v České republice. Při aktuálním rozšíření nosičství lentiviru M-V v našich chovech je důkladné patomorfologické vyšetření vyřazovaných zvířat nezbytné.

Literatura

- CUTLIP, R. C. - JACKSON, T. A. - LEHMKUHL, H. D.: Lesions of ovine progressive pneumonia: interstitial pneumonitis and encephalitis. *Amer. J. Veter. Res.*, 40, 1979, s. 1370-1374.
- CUTLIP, R. C. - LEHMKUHL, H. D. - WOOD, R. L. aj.: Arthritis associated with ovine progressive pneumonia. *Amer. J. veter. Res.*, 46, 1985, s. 65-68.
- CUTLIP, R. C. - YOUNG, S.: Sheep pulmonary adenomatosis (jaagsiekte) in the United States. *Amer. J. veter. Res.*, 43, 1982, s. 2108-2113.
- DAWSON, M.: Pathogenesis of Maedi-visna. *Veter. Rec.*, 120, 1987, s. 451-454.
- DI GUARDO, G. - CONDOLEO, R. - AUTORINO, G. L.: Multicentric lymphosarcoma associated with pulmonary adenomatosis (jaagsiekte), pulmonary lymphoid hyperplasia, and lymphoid interstitial pneumonia in a ewe. *Veter. Path.*, 29, 1992, s. 262-264.
- GENDELMAN, H. E. - NARAYAN, O. - KENNEDY-STOSKOFF, S. aj.: Tropism of sheep lentiviruses for monocytes; susceptibility to infection and virus gene expression increase during maturation of monocytes to macrophages. *J. Virol.*, 58, 1986, s. 67-74.
- GEORGSSON, G. - PALSSON, P. A.: The histopathology of maedi: a slow, viral pneumonia of sheep. *Veter. Path.*, 8, 1971, s. 63-80.
- GONZÁLEZ, L. - JUSTE, R. A. - CUERVO, L. A. aj.: Pathological and epidemiological aspects of the coexistence of Maedi-Visna and sheep pulmonary adenomatosis. *Res. veter. Sci.*, 54, 1993, s. 140-146.
- GUDNADOTTIR, M.: Visna-Maedi in sheep. *Progr. med. Virol.*, 18, 1974, s. 336-349.
- HALOUZKA, R. - CELER, V.: Výskyt patologických změn v orgánech ovcí sérologicky pozitivních na protilátky proti viru Maedi-Visna. *Vet. Med. - Czech*, 38, 1993, s. 647-658.
- JUBB, K. V. F. - KENNEDY, P. C. - PALMER, N.: Ovine progressive pneumonia. In: *Pathology of Domestic Animals*. 3rd ed., 2, 1985, s. 533-536.
- KENNEDY, P. G. E. - NARAYAN, O. - GHOTBI, Z. aj.: Persistent expression of Ia antigen on viral genome in Visna-Maedi virus induced inflammatory cells. Possible role of lentivirus induced interferon. *J. exp. Med.*, 162, 1985 : 1970-1983.

- LAIRMORE, M. D. - POULSON, J. M. - ADDUCCI, T. A. aj.: Lentivirus-induced lymphoproliferative disease. Comparative pathogenicity of phenotypically distinct ovine lentivirus strains. *Amer. J. Path.*, 130, 1988, s. 80-90.
- MARKSON, L. M. - TERLECKI, S.: The experimental transmission of ovine pulmonary adenomatosis. *Path. Veter.*, 1, 1964, s. 269-288.
- NARAYAN, O.: Lentiviruses are etiological agents of chronic diseases in animals and acquired immunodeficiency syndrome in humans. *Can. J. veter. Res.*, 54, 1990, s. 42-48.
- PERRIN, G.: Le rétrovirus de l'arthrite encéphalite caprine. *Bull. Acad. vétér. France*, 62, 1989, s. 33-48.
- PETURSSON, G.: Pathogenesis of Visna. *Lab. Invest.*, 35, 1976, s. 402-412; 444-460.
- PRITCHARD, G. C. - DONE, S. H.: Concurrent Maedi-Visna virus infection and pulmonary adenomatosis in a commercial breeding flock in East Australia. *Veter. Rec.*, 127, 1990, s. 197-200.
- SIGURDSSON, B. - PALSSON, P. A. - GRIMSSON, H.: Visna, a demyelinating transmissible disease of sheep. *J. Neuropath.*, 16, 1957, s. 389-403.
- WATT, N. J. - KING, T. J. - COLLIE, D. aj.: Clinicopathological investigation of primary, uncomplicated Maedi-Visna virus infection. *Veter. Rec.*, 131, 1992, s. 455-461.
- ZINK, M. C. - NARAYAN, O.: Lentivirus-induced interferon inhibits maturation and proliferation of monocytes and restricts the replication of caprine arthritis-encephalitis virus. *J. Virol.*, 63, 1989, s. 2578-2584.

Došlo 3. 6. 1993

HALOUZKA, R. - CELER, V. (University of Veterinary Medicine and Pharmaceutical Sciences, Brno):

Pathology and differential diagnostics of the Maedi-Visna disease.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (12): 705-721.

The intensity and distribution of typical lesions in organs and tissues were determined in 38 sheep with serological positivity to the Maedi-Visna disease. The lesions in the lungs, mammary gland, CNS and joints were evaluated according to the number of marks. The lungs, mammary gland and CNS were affected most frequently. Concurrent incidence of pulmonary adenomatosis was determined in 57 % of the examined cases.

Differential diagnostics of typical M-V virus induced lesions and pulmonary adenomatosis is discussed in this paper. Identification of eight cases of meningoencephalitis, which is considered as the initial stage of Visna form, is a priority observation in the Czech Republic. With respect to distribution of lentivirus carriers, the authors emphasize the need of detailed pathomorphological examination of culled sheep.

sheep; Maedi-Visna virus; pathology; concurrent lesions; differential diagnostics

Contact Address:

Doc. MVDr. Roman H a l o u z k a , DrSc., Vysoká škola veterinární a farmaceutická, Palackého 1-3, 612 42 Brno, Czech Republic
Tel. 05 41321107, fax 05 41211151

INSTITUTE OF AGRICULTURAL AND FOOD INFORMATION

Slezská 7, 120 56 Praha 2, Czech Republic

Fax.: (00422) 257 090

In this institute scientific journals dealing with the problems of agriculture and related sciences are published on behalf of the Czech Academy of Agricultural Sciences and Slovak Academy of Agricultural Sciences. The periodicals are published in the Czech or Slovak languages with summaries in English or in English with summaries in Czech or Slovak.

Subscription to these journals be sent to the above-mentioned address.

Periodical	Number of	
	issues per year	pages
Rostlinná výroba (Plant Production)	12	96
Veterinární medicína (Veterinary Medicine - Czech)	12	64
Živočišná výroba (Animal Production)	12	96
Zemědělská ekonomika (Agricultural Economics)	12	96
Lesnictví (Forestry)	12	48
Zemědělská technika (Agricultural Engineering)	4	80
Ochrana rostlin (Plant Protection)	4	80
Genetika a šlechtění (Genetics and Plant Breeding)	4	80
Zahradnictví (Horticultural Science)	4	80
Potravinářské vědy (Food Sciences)	6	80

INHIBÍCIA RASTU NIEKTORÝCH MIKROSKOPICKÝCH HÚB VYBRANÝMI ORGANICKÝMI KYSELINAMI

E. Čonková, E. Para, A. Kočíšová

Univerzita veterinárskeho lekárstva, Košice

Bol odskúšaný fungicídny účinok piatich organických kyselín (kyselina mliečna, octová, mravčia, šťaveľová a propiónová) v koncentráciách 3, 5, 10, 20 a 50 ml/l na deviatich vybraných druhoch mikroskopických húb z Československej zbierky mikroorganizmov, Brno. Nedostatočný fungicídny účinok preukázali všetky kyseliny v koncentráciách 3, 5 a 10 ml/l. Pri použití kyseliny propiónovej v koncentrácii 20 ml/l bola zistená inhibícia rastu piatich druhov mikromycét, zatiaľ čo kyselina mravčia s rovnakou koncentráciou inhibovala rast dvoch druhov mikroskopických húb. Antifungálny účinok kyseliny octovej bol zistený až v koncentrácii 50 ml/l.

mikroskopické huby; organické kyseliny; fungicídna aktivita; testácia

Výskyt mikroskopických húb v organických látkach živočíšneho a rastlinného pôvodu aktualizuje problém ich eliminácie z prostredia. Študuje sa fungicídny účinok rôznych prípravkov na organickej alebo anorganickej báze, ale aj ich vplyv na substráty rôzneho charakteru.

Osobitnú pozornosť v poslednom období venujú naši a zahraniční odborníci organickým kyselinám hlavne v tých oblastiach, kde fungicídne prípravky na báze anorganických látok predstavujú určité riziká pre živočíšny organizmus.

Zníženie počtu mikroskopických húb a kvasiniek v prachu a podstielke na hydinárskej farme s výkrmom brojlerov po použití aerosólovej dezinfekcie vzduchu kyselinou mliečnou sledoval napr. Fišer (1978). Laníková a i. (1988) zistili, že obsah mikroskopických húb v kŕmnych zmesiach hydiny je možné znížiť pôsobením prípravku Feed Savour Dry, ktorý je vyrobený na báze organických kyselín. Müller (1989) na zamedzenie rozmnožovania mikromycét pri skladovaní obilnín po žatve odporúča okrem iných opatrení aj chemickú konzerváciu, napr. kyselinou propiónovou alebo močovinou. Antifungálne účinky kalcium propionátu overili Fiorentin a Barioni (1991) na niektorých druhoch rodu *Aspergillus*.

MATERIÁL A METÓDA

Pre experiment v laboratórnych podmienkach boli použité organické kyseliny: mliečna, šťaveľová, octová, mravčia a propiónová v koncentráciách 3, 5, 10, 20 a 50 ml/l.

Fungicídny účinok týchto kyselín sa sledoval na deviatich druhoch mikroskopických húb získaných z Československej zbierky mikroorganizmov, Brno.

Na testáciu fungicídnej aktivity sledovaných kyselín bola použitá metóda difúzie dezinfekčných prostriedkov do agaru vypracovaná A j v a z j a n o m (1987), ktorí sme technicky modifikovali.

Suspénzia kultúry mikroskopických húb v množstve 10^8 h.j./ml bola naočkovaná na povrch Sabouraudovho agaru, do ktorého boli vyhlbené jamky s priemerom 5 mm. Pomocou pipety sa do nich aplikovalo po 0,1 ml jednotlivých koncentrácií testovaných kyselín.

Po 5-dňovej inkubácii pri teplote 21 °C sa makroskopicky hodnotili vytvorené zóny difúzie. Pozitívne sa hodnotil fungicídny účinok organických kyselín so zónou difúzie s priemerom minimálne 10 mm (vrátane priemeru jamky). Experiment bol opakovaný päťkrát.

VÝSLEDKY

Výsledky pokusov zaznamenané v tab. I predstavujú priemerné aritmetické hodnoty veľkosti zón inhibície rastu mikroskopických húb v dôsledku fungicídnej aktivity testovaných kyselín.

Kyselina mliečna a kyselina šťaveľová nevykazovali fungicídnu aktivitu v žiadnej z použitých koncentrácií. Účinnosť ďalších troch kyselín sa dá vyjadriť poradím: kyselina propiónová, kyselina mravčia a kyselina octová. Ani jedna z týchto kyselín nepôsobila fungicídne v koncentráciách nižších ako 20 ml/l. V tejto koncentrácii kyselina propiónová inhibovala rast piatich mikroskopických húb ako je *Penicillium glabrum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus* a *Cladosporium sphaerospermum*. Pre *Aspergillus flavus* nebol zistený požadovaný antifungálny účinok ani v koncentrácii 50 ml/l. Ako dostatočnú inhibíciu rastu pri použití kyseliny mravej v koncentrácii 20 ml/l možno hodnotiť len dva prípady (*Aspergillus fumigatus* a *Cladosporium sphaerospermum*) a pri koncentrácii 50 ml/l šesť prípadov (*Penicillium glabrum*, *Rhizopus stolonifer*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum*). Kyselina octová v uvedených pokusoch sa javí najmenej fungicídne účinná. Dostatočnú fungicídnu aktivitu prejavila pri inhibícii rastu dvoch mikromycét (*Aspergillus fumigatus* a *Fusarium moniliforme*), a to až v koncentrácii 50 ml/l.

Percentuálne vyhodnotenie fungicídnej aktivity dvoch najúčinnějších kyselín (mravej a propiónovej) sú uvedené v tab. II. Praktické hľadisko využitia svedčí v prospech kyseliny propiónovej.

DISKUSIA

Kontaminácia prostredia mikroskopickými hubami poskytuje širokú oblasť vedeckého štúdia. Napr. F a s s a t i o v á (1988) uvádza výskyt rodu *Penicillium* vo všetkých zložkách biocenóz, t.j. pôde, vode, ovzduší, na povrchu rastlín a živočíchov, ako aj v potravinách a surovinách organického a anorganického pôvodu.

Prehľad výskytu mikroskopických húb v potravinách a krmivách podáva aj S a m s o n (1989), ktorý zároveň upozornil aj na schopnosť tvorby rezistencie u niektorých druhov rodu *Penicillium* voči konzervačným prostriedkom na báze

I. Priemerné aritmetické hodnoty veľkosti zón difúzie testovaných organických kyselín s pozitívnou fungicídnou aktivitou – Average arithmetic values of the diffusion zone area for tested organic acids with positive fungicidal activity

Druh mikroskopickej huby ¹	Zóna inhibície rastu mikroskopických húb (mm) ²								
	kyselina octová ³ (ml/l)			kyselina mravčia ⁴ (ml/l)			kyselina propiónová ⁵ (ml/l)		
	10	20	50	10	20	50	10	20	50
<i>Penicillium glabrum</i>	0	6,5	7,5	6	8	13	6	10,5	13,5
<i>Mucor fragilis</i>	0	0	7	0	7	9,5	0	7	10,5
<i>Rhizopus stolonifer</i>	0	0	6	7	8,5	11,5	6,5	7,5	13,5
<i>Absidia glauca</i>	0	0	0	0	0	7,5	0	7	12,5
<i>Aspergillus niger</i>	0	0	6,5	0	7	9	6,5	10	12,5
<i>Aspergillus flavus</i>	0	0	6	0	0	10	0	6	8,5
<i>Fusarium moniliforme</i>	6,5	9	11,5	0	7,5	10	6	10	11
<i>Aspergillus fumigatus</i>	0	6,5	10	6	10	12,5	7,5	10,5	12,5
<i>Cladosporium sphaerospermum</i>	0	5,5	8,5	8,5	10	15	6,5	10,5	12,5

¹mould species, ²zone of growth inhibition of moulds, ³acetic acid, ⁴formic acid, ⁵propionic acid

II. Percentuálne vyhodnotenie fungicídnosti kyseliny mravčej a propiónovej – Percentual evaluation of the fungicidal activity of formic acid and propionic acid

Kyselina mravčia ¹ (ml/l)		Kyselina propiónová ² (ml/l)	
20	50	20	50
22,2	67	55,5	88,9

¹formic acid, ²propionic acid

organických kyselín (kyselina benzoová, sorbit sodný, kyselina sorbová, kyselina propiónová). Literárne údaje o inhibičných schopnostiach organických kyselín pri rozmnožovaní mikroorganizmov (Zemanová a Hrubšová, 1989), ako aj možnosti použitia organických kyselín ako dezinfekčných prostriedkov (Böhmer, 1987) viedli k rozhodnutiu uskutočniť popísaný experiment.

Výber mikroskopických húb pre testáciu bol urobený na základe literárnych údajov, ktoré sa zaoberajú pôvodom a výskytom najčastejších druhov mikroskopických húb na rôznych substrátoch (Gedek, 1980; Jesenská, 1983; Wirgha, 1987; Fassatiová, 1988; Samson aj., 1989 a iní).

Rozsah koncentrácií organických kyselín vybraných do experimentu bol volený na základe predpokladu ich účinnosti pri inhibícii rastu mikromycét v porovnaní s literárnymi údajmi Müllera (1989) a Adamsa (1989). Adams (1989) pozoroval inhibičnú schopnosť kyseliny propiónovej už pri koncentrácii 0,1 % a Müller (1989) v rozsahu 0,2 a 0,4% koncentracii, čo predstavuje nižšie hodnoty v porovnaní s opísaným experimentom (20 a 50 ml/l). Vysvetliť sa to dá tým, že pri testácii zbierkových druhov mikroskopických húb kvôli dosiahnutiu plynulého porastu mikroskopických húb na povrch Sabouraudovho agaru bola aplikovaná vysoká koncentrácia suspenzie spór (10^8 h.j./l). Müller (1989) a Adams (1989) overovali kyselinu propiónovú pri inhibícii rastu mikromycét kontaminujúcich krmné zmesi a obilniny. V týchto substrátoch pri dobrých podmienkach uskladnenia bol zistený nižší počet h.j. v 1 g vyšetrovanej vzorky (10^3 až 10^4 h.j./g; Čonková, 1991), ako aj rozmanitejšie zastúpenie druhov v porovnaní s mikroskopickými hubami vybranými do pokusu. Táto druhová rôznorodosť predpokladá vytvorenie rôznej rezistencie mikromycét voči konzervačným prípravkom ako to popisuje aj Samson (1989). Z tejto rezistenčnej schopnosti vyplýva zrejme aj dosiahnutie pozitívneho antifungálneho účinku až pri vyšších koncentráciách.

Zameranie výskumu v budúcnosti bude nasmerované na sledovanie inhibície rastu mikroskopických húb v krmných zmesiach, ako aj na zisťovanie vytvárania rezistencie voči prípravkom, ktoré by mali slúžiť na ich elimináciu.

Literatúra

- ADAMS, C. A.: Plísne a mykotoxíny. In: Zbor. Ref. Skladování obilí a výroba krmných směsí, Pečky, 1989, s. 7-9.
- AJVAZJAN, B. D.: Fungicidnaja aktivnost' dezinficirujuščich sredstv. Problemy veterinarnoj dezinfekcii objektov životnovodstva. Moskva, 1987, s. 60-64.
- BÖHM, R.: Organic acids as disinfectants. Fleischwirtschaft, 67, 1987, s. 705-706.
- ČONKOVÁ, E.: Štúdium hygienickej nezávadnosti krmných zmesí používaných v chove kurčiat so zameraním na výskyt plesní. In: Zbor. Ref. Ekotoxikológia potravinového reťazca, Košice, 27 - 28. 11. 1991, s. 50-55.
- FASSATIOVÁ, O.: Toxinogenní druhy rodu *Penicillium* Link a klíč k určení běžněji se vyskytujících zástupců v Čechách. Čes. Mykol. 42, 1988, s. 12-21.
- FIorentin, L. - BArioni, W.: Acao antifungica do propionato de calcio contra amostras de *Aspergillus* (Grupo *flavus*), isolados de ingredientes e rações avícolas em Santa Catarina. Rev. Mikrobiol., (Sao Paulo), 22, 1991, s. 141-146.
- FIŠER, A.: Disinfection of air and dust in fattening houses for chickens by lactic acid aerosol. Acta veter. (Brno), 47, 1978, s. 173-183.
- GEDEK, B.: Möglichkeiten und Grenzen der mikrobiologischen Futtermittelkontrolle. Dtsch. tierärztl. Wschr., 1980, s. 37-40.
- JESENSKÁ, Z.: Fuzária v obilných zrnách Slovenskej socialistickej republiky počas klimaticky priaznivej žatvy. Českoslov. Hyg., 28, 1983, s. 11-16.
- LANÍKOVÁ, A. aj.: Vliv zplísňenosti krmiv na zdraví a užitkovost drůbeže. [Závěrečná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1988.
- MÜLLER, H. M.: Massnahmen zur Minderung von Mykotoxinbildung und Anreicherung in Futtermitteln. Dtsch. tierärztl. Wschr., 1989, s. 363-368.

- SAMSON, R. A.: Filamentous fungi in food and feed. J. appl. Bact., 1989, s. 27-35.
- WEISSBACH, F. - KWELLA, M.: Schimmelpilzbefall und Futtergetreidequalität. Tierzucht, 12, 1986, s. 552-555.
- WIRGHA, D.: Praktické skúsenosti s plesňami rodu *Aspergillus* v okrese Považská Bystrica. Krmivárstvá a služby, XXIII, 1987, s. 190-191.
- ZEMANOVÁ, D. - HRUBŠOVÁ, E.: Zlepšenie mikrobiálnej kvality kurčiat ošetrovaním roztokmi organických kyselín. Hydina, XXXI, 1989, s. 161-165.

Došlo 28. 6. 1993

ČONKOVÁ, E. - PARA, L. - KOČIŠOVÁ, A. (University of Veterinary Medicine, Košice):
Inhibition of the moulds growth by selected organic acids.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (12): 723-727.

Fungicidal effects of five selected organic acids (lactic, acetic, formic, oxalic, and propionic) in concentrations 3, 5, 10, 20 and 50 ml/l on nine selected species of moulds were tested.

Lactic and oxalic acids did not prove the satisfactory fungicidal activity in any of the chosen concentrations. The antifungal effect of the other three acids, manifested by the growth inhibition of the tested moulds is shown in Tab. I and it can be expressed by sequence: propionic acid, formic acid, and acetic acid. These acids also had effects only in concentrations 20 ml/l and 50 ml/l. Propionic acid in concentration 20 ml/l inhibited the growth of five moulds (*Penicillium glabrum*, *Aspergillus niger*, *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus fumigatus*, *Cladosporium sphaerospermum*).

In testing of concentration 50 ml/l, the lower fungicidal ability was ascertained only in growth suppression of *Aspergillus flavus*.

The fungicidal activity of formic acid was registered in concentration 20 ml/l in two cases and in concentration 50 ml/l in six cases. Acetic acid inhibited the growth in concentration 50 ml/l only in two cases.

Tab. II shows the percentual evaluation of propionic acid and formic acid with regard to their inhibition abilities.

The fungicidal efficiency of propionic acid resulting from the experiment is 88.9 %.

moulds; organic acids; fungicidal activity; testing

Contact Address:

MVDr. Eva Čonková, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73,
041 81 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 32111-15, fax 095 767675



**VÝHODNÝ LEASING
STROJŮ A ZAŘÍZENÍ
NEJEN PRO ZAČÍNÁJÍCÍ
PODNIKATELE**

ADEKO a. s. Vám nabízí

- ☐ kapitálovou účast v jiných podnikatelských subjektech
- ☐ společné podnikání
- ☐ poradenskou, konzultační a zprostředkovatelskou činnost v oboru ekologie
- ☐ investorskou a investiční činnost
- ☐ řešení odbytových potíží výrobcům a obchodním organizacím formou leasingového financování

**ADEKO a. s.
Slezská 7
120 56 Praha 2**

**tel.: 258 342
fax: 207 229**



TELESNÁ HMOTNOSŤ A SKELETÁLNY RAST SAMÍC POTKANA PO OVARIIEKTÓMII

Š. Číkoš, S. Kuchár, J. Koppel

Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Košice

Sledovali sme telesnú hmotnosť a skeletálny rast samíc potkana v rôznom období po ovariektómii. Zvieratá boli ovariektomované v 30. dni života; polovica z nich bola usmrtená v 60. a druhá polovica v 130. dni života. U ovariektomovaných samíc boli zaznamenané vyššie prírastky telesnej hmotnosti a dĺžky chvosta (v porovnaní s intaktnými samicami) najmä medzi 40. a 60. dňom života. Po 90. dni života už neboli prírastky telesnej hmotnosti a dĺžky chvosta u ovariektomovaných samíc signifikantne vyššie ako u intaktných samíc. Dĺžka tŕbie bola u ovariektomovaných samíc signifikantne vyššia ako u intaktných samíc tak v 60. ako aj v 130. dni života. Rýchlosť longitudinálneho rastu tŕbie, meraná (tetracyklínovou metódou) medzi 57. a 59. a medzi 127. a 129. dňom života, však bola u ovariektomovaných samíc signifikantne vyššia iba v prvom meranom intervale. Tieto výsledky naznačujú, že zmeny v skeletálnom raste a v prírastkoch telesnej hmotnosti majú po ovariektómii podobný časový priebeh.

potkan; ovariektómia; skeletálny rast; telesná hmotnosť

Pohlavné hormóny majú dôležitú úlohu v regulácii telesného rastu zvierat. V účinku týchto hormónov na telesný rast sú určité medzidruhové rozdiely, ale možno zaznamenať aj zhodné efekty, čo ukazuje na možnosť podobných mechanizmov akými pohlavné hormóny regulujú rast u rôznych živočíšnych druhov. Androgény majú na telesný rast zväčša stimulačný vplyv a to tak v prípade laboratórnych zvierat (potkan, myš), ako i hospodárskych zvierat (hovädzí dobytok, ovce, ošípané); účinok estrogénov je u hospodárskych zvierat zväčša stimulačný, zatiaľ čo u potkana a myši pôsobia estrogény inhibične (Galbraith a Topps, 1981; Wiedemann, 1981; Ford a Klindt, 1989).

Ovariektomované samice potkana dosahujú vyššiu telesnú hmotnosť ako intaktné samice, pričom prírastky telesnej hmotnosti nie sú zvýšené trvale, ale iba určitý čas po ovariektómii, po ktorom sa prírastky ovariektomovaných zvierat vracajú na úroveň prírastkov intaktných samíc (Gentry a Wade, 1976; McElroy a Wade, 1987). Keďže ovariektomované samice potkana dosahujú okrem väčšej telesnej hmotnosti aj väčšiu dĺžku kostí (Grunt, 1964; Sloba Bosch, 1975; Clark a Tarttelin, 1982), zisťovali sme či k zrýchleniu skeletálneho rastu dochádza v tom istom čase ako k zvýšeniu prírastkov telesnej hmotnosti. Sledovali sme rast kostí v rôznom časovom období po ovariektómii - v dobe zvýšených prírastkov telesnej hmotnosti, ako i v dobe keď prírastky telesnej hmotnosti ovariektomovaných samíc poklesli na úroveň intaktných samíc.

MATERIÁL A METÓDY

V experimente boli použité samice potkanov kmeňa Wistar. Zvieratá boli umiestnené vo zverinci s regulovaným svetelným režimom: 12 h svetlo - 12 h tma a riadenou teplotou vzduchu ($21 \pm 1^\circ\text{C}$); zvieratá mali voľný prístup k pitnej vode a k diéte DOS 2b (Velaz, Praha).

V 30. dni života bolo ovariektomovaných 20 samíc; ďalších 20 samíc bolo intaktných. V 60. dni života bola usmrtená polovica zvierat (10 ovariektomovaných a 10 intaktných) a v 130. dni života bola usmrtená druhá polovica zvierat. Telesná hmotnosť a dĺžka chvosta boli merané v 10-dňových intervaloch od 30. do 60. resp. 130. dňa života. Po usmrtení bola zvieratám odobratá pravá tŕbia a mikrometrom zmeraná jej dĺžka. 72 a 24 h pred usmrtením (t.j. v 57. a 59. resp. 127. a 129. dni života) bol zvieratám aplikovaný oxytetracyklín (Oxymykoin, Spofa Praha; 10 mg/1 kg telesnej hmotnosti, i.p.) na určenie rýchlosti longitudinálneho rastu tŕbie z proximálnej rastovej platničky tetracyklínovou metódou (H a n s s o n , 1967).

Mikroskopické preparáty tŕbie na určenie rýchlosti longitudinálneho rastu boli pripravené nasledovne: tŕbia bola na proximálnom konci rozrezaná žiletkou medzi *condylus medialis* a *condylus lateralis* a fixovaná 24 h vo formalíne. Potom boli urobené 80 μm hrubé longitudinálne rezy na kryostate (Reichert - Jung Cryocut 1800, Leica, SRN). Rezy boli dehydratované etanolom, presýtené xylénom, potom uzavreté do Solakrylu BMX a fotografované pod fluorescenčným mikroskopom (Jenalumar contrast, Carl Zeiss Jena) spolu s podložitým sklíčkom s 1 mm škálou rozdelenou po 10 μm . Vzdialenosť medzi dvomi fluoreskujúcimi oxytetracyklínovými pásmi bola meraná z diapozitívov.

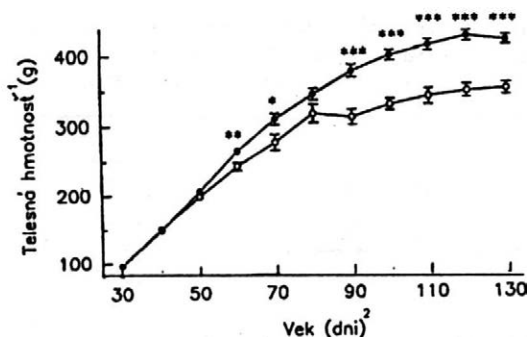
Štatistické hodnotenie výsledkov bolo uskutočnené nepárovým Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Telesná hmotnosť a dĺžka chvosta sa medzi ovariektomovanými (OVX) a intaktnými samicami signifikantne nelíšili do 60. dňa života. Po 60. dni boli u OVX samíc signifikantne (okrem 70. dňa pre dĺžku chvosta a 80. dňa pre telesnú hmotnosť) vyššie (obr. 1, 2).

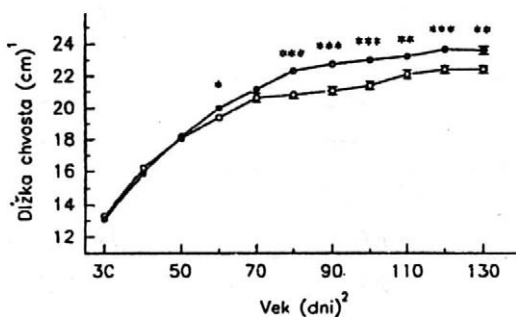
Prírastky telesnej hmotnosti a dĺžky chvosta boli hodnotené v 10-dňových intervaloch. V prvom intervale experimentu (30. - 40. deň života) boli prírastky telesnej hmotnosti u intaktných samíc signifikantne vyššie ako OVX samíc. Medzi 40. a 60. dňom života boli prírastky signifikantne vyššie u OVX samíc. Po 60. dni života už prírastky telesnej hmotnosti OVX samíc signifikantne neprevyšovali prírastky intaktných samíc (okrem intervalu 80.- 90. deň, kedy bola u intaktných samíc zaznamenaná strata telesnej hmotnosti) - tab. I.

Prírastky dĺžky chvosta sa medzi OVX samicami a intaktnými samicami v prvom intervale experimentu signifikantne nelíšili; medzi 40. a 60. dňom života boli prírastky signifikantne vyššie u OVX samíc. Po 60. dni života prírastky dĺžky chvosta OVX samíc signifikantne neprevyšovali prírastky intaktných samíc (okrem intervalu 70.- 80. deň) - tab. II.



1. Telesná hmotnosť ovariectomovaných (plné krúžky) a intaktných (prázdné krúžky) samíc potkana. Hodnoty sú udané ako aritmetické priemery $\pm$ SEM. Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené Studentovým *t*-testom: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ – Body weight of ovariectomized (full circles) and intact (open circles) female rats. The values are arithmetical means $\pm$ SEM. The significance of differences between the groups was calculated by Student's *t*-test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

¹body weight, ²age (days)



2. Dĺžka chvosta ovariectomovaných (plné krúžky) a intaktných (prázdné krúžky) samíc potkana. Hodnoty sú udané ako aritmetické priemery $\pm$ SEM. Rozdiely medzi skupinami boli hodnotené Studentovým *t*-testom: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ – Tail length of ovariectomized (full circles) and intact (open circles) female rats. The values are arithmetical means $\pm$ SEM. The significance of differences between the groups was calculated by Student's *t*-test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

¹tail length, ²age (days)

Dĺžka tŕbie bola u OVX samíc signifikantne väčšia ako u intaktných samíc tak v 60. ako aj v 130. dni života. Podobne rýchlosť longitudinálneho rastu tŕbie z proximálnej rastovej platničky medzi 57. a 59. dňom života bola u OVX samíc signifikantne vyššia ako u intaktných samíc. Medzi 127. a 129. dňom života sa však už rýchlosť longitudinálneho rastu tŕbie medzi OVX samicami a intaktnými samicami signifikantne nelíšila (tab. III).

I. Zmeny telesnej hmotnosti (prírastok alebo strata) u ovariectomovaných (OVX) a intaktných (INT) samíc potkana medzi 30. a 130. dňom života – Changes of body weight (gain or loss) in ovariectomized (OVX) and intact (INT) females between the 30th and 130th day of age

Deň ¹		OVX	INT	t-test
30. - 40.	g	51,9 ± 0,62	54,7 ± 0,49	**
	%	54,5 ± 0,75	57,7 ± 0,89	**
40. - 50.	g	56,7 ± 0,68	46,9 ± 1,18	***
	%	38,0 ± 0,48	31,2 ± 0,44	***
50. - 60.	g	61,2 ± 1,38	43,2 ± 1,29	***
	%	30,2 ± 0,48	22,0 ± 0,47	***
60. - 70.	g	40,2 ± 2,87	36,6 ± 1,06	
	%	15,1 ± 0,82	15,3 ± 0,42	
70. - 80.	g	49,8 ± 3,96	40,4 ± 6,26	
	%	15,6 ± 1,5	14,3 ± 14,3	
80. - 90.	g	26,2 ± 2,58	-5,60 ± 5,01	***
	%	7,35 ± 0,62	-1,51 ± 1,50	***
90. - 100.	g	25,5 ± 3,29	17,5 ± 3,62	
	%	6,95 ± 1,05	6,04 ± 1,44	
100. - 110.	g	13,7 ± 1,30	16,0 ± 1,46	
	%	3,44 ± 0,32	4,73 ± 0,38	*
110. - 120.	g	12,5 ± 1,01	7,40 ± 2,91	
	%	3,05 ± 0,26	2,39 ± 1,06	
120. - 130.	g	-6,66 ± 0,83	3,30 ± 1,70	***
	%	-1,54 ± 0,17	0,91 ± 0,55	**

Hodnoty sú udané v gramoch i ako percento východiskovej telesnej hmotnosti (t.j. telesnej hmotnosti na začiatku každého 10-dňového intervalu) ako aritmetické priemery ± SEM. Rozdiely medzi uvedenými skupinami zvierat boli hodnotené Studentovým *t*-testom: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ – The values are given in grams and as a percentage of the initial body weight (i.e. body weight at the beginning of each 10 days' interval); they are arithmetical means ± SEM. The significance of differences between the groups was calculated by Student's *t* test: * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$; *** = $p < 0.001$

¹ day

II. Prírastky dĺžky chvosta u ovariectomovaných (OVX) a intaktných (INT) samíc potkana medzi 30. a 130. dňom života – The tail length increments in ovariectomized (OVX) and intact (INT) females between the 30th and 130th day of age

Deň ¹		OVX	INT	t-test
30. - 40.	cm	2,85 ± 0,033	2,83 ± 0,034	
	%	2,17 ± 0,040	2,11 ± 0,022	
40. - 50.	cm	2,23 ± 0,025	1,94 ± 0,029	***
	%	1,40 ± 0,016	1,19 ± 0,016	***
50. - 60.	cm	1,80 ± 0,013	1,38 ± 0,095	*
	%	0,9 ± 0,055	0,7 ± 0,048	*
60. - 70.	cm	1,26 ± 0,056	1,24 ± 0,072	
	%	0,63 ± 0,032	0,63 ± 0,033	
70. - 80.	cm	1,16 ± 0,062	0,21 ± 0,092	***
	%	0,54 ± 0,030	0,10 ± 0,045	***
80. - 90.	cm	0,43 ± 0,045	0,21 ± 0,106	
	%	0,19 ± 0,020	0,09 ± 0,049	
90. - 100.	cm	0,26 ± 0,048	0,36 ± 0,075	
	%	0,11 ± 0,021	0,17 ± 0,036	
100. - 110.	cm	0,21 ± 0,057	0,67 ± 0,079	***
	%	0,09 ± 0,024	0,31 ± 0,036	***
110. - 120.	cm	0,44 ± 0,07	0,34 ± 0,030	
	%	0,19 ± 0,033	0,15 ± 0,014	
120. - 130.	cm	-0,07 ± 0,101	0,06 ± 0,047	
	%	-0,031 ± 0,043	0,029 ± 0,020	

Hodnoty sú udané v centimetroch i ako percento východiskovej dĺžky chvosta (t.j. dĺžky chvosta na začiatku každého 10-dňového intervalu) ako aritmetické priemery ± SEM. Rozdiely medzi uvedenými skupinami zvierat boli hodnotené Studentovým t-testom: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$ – The values are given in centimeters and as a percentage of the initial tail length (i.e. tail length at the beginning of each 10 days' interval), they are arithmetical means ± SEM. The significance of differences between the groups was calculated by Student's t test: * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

¹day

III. Dĺžka tŕbie v 60. a 130. dni života (DT) a rýchlosť longitudinálneho rastu tŕbie medzi 57. a 59. a medzi 127. a 129. dňom života (RRT) u intaktných (INT) a ovariectomovaných (OVX) samíc zabíjaných v 60. (INT 60, OVX 60) a 130. (INT 130, OVX 130) dni života – Length of tibia on the 60th and 130th day of age (DT) and rate of longitudinal growth of tibia between the 57th - 59th and between the 127th - 129th day of age (RRT) in intact (INT) and ovariectomovied (OVX) females killed on the 60th (INT 60, OVX 60) and on the 130th (INT 130, OVX 130) day of age

	INT 60	OVX 60	INT 130	OVX 130
DT (mm)	36,2 ± 0,23 ^a	37,1 ± 0,23	40,6 ± 0,34	42,2 ± 0,35 ^b
RRT (µm/48 h)	347,2 ± 11,7	444,7 ± 13,6 ^c	44,0 ± 3,0	51,5 ± 4,87

Hodnoty sú udané ako aritmetické priemery ± SEM. Rozdiely medzi OVX a INT samičami zabíjanými v rovnakom veku boli hodnotené Studentovým *t*-testom: a = $p < 0,05$; b = $p < 0,01$; c = $p < 0,001$ – The values are arithmetical means ± SEM. The differences between the OVX and INT females killed at the same age were calculated by Student's *t*-test: a = $p < 0.05$; b = $p < 0.01$; c = $p < 0.001$

DISKUSIA

Výsledky ukazujú inhibičný efekt ovariálnych hormónov na telesnú hmotnosť a skeletálny rast samíc potkana, čo je v súlade s údajmi iných autorov (K a k o - l e w s k i a i., 1968; C l a r k a T a r t t e l i n, 1982; J a n s s o n a i., 1983). Signifikantne nižšie prírastky telesnej hmotnosti u ovariectomovaných samíc ako u intaktných samíc v prvom intervale experimentu (t.j. bezprostredne po ovariectómii) boli zrejme následkom chirurgickej traumy.

G r u n t (1964) sledoval telesnú hmotnosť a dĺžku tela (v jednomesačných intervaloch, do 180. dňa života) u predpubertálne ovariectomovaných samíc potkana, pričom zaznamenal intenzívnejší telesný rast týchto zvierat najmä prvých 35 dní po operácii (vyššie prírastky dĺžky tela resp. telesnej hmotnosti však u ovariectomovaných zvierat, v porovnaní s intaktnými zvieratami, zaznamenal až do 90. resp. 120. dňa života). Meranie v kratších intervaloch (10 dní) v našej práci ukázalo, že vyššie prírastky telesnej hmotnosti a dĺžky chvosta možno po predpubertálnej ovariectómii samíc potkana zaznamenať najmä medzi 40. a 60. dňom života. Po 90. dni života už prírastky ovariectomovaných samíc neboli signifikantne vyššie ako prírastky intaktných samíc, avšak signifikantne vyššia telesná hmotnosť a dĺžka chvosta ovariectomovaných samíc, získaná v období intenzívnejšieho telesného rastu, sa udržala až do konca experimentu (130. dňa života).

Mechanizmy akými estrogény inhibujú telesný rast potkanov nie sú jasné. Popri anorektickom efekte estrogénov, ktorý môže retardáciu telesného rastu vysvetliť len čiastočne (R o y a W a d e, 1977; Č í k o š a i., 1992), sú zrejme dôležité aj ďalšie účinky estrogénov, napr. vplyv na sekréciu rastového hormónu (M o d e a i., 1982; J a n s s o n a F r o h m a n, 1987), alebo iných hormónov (C o y n e a K i t a y, 1969; D ' A n g e l o a F i s h e r, 1969; C a s t r o - V a z q u e z a i., 1981). Ovplyvnenie sekrécie rastového hormónu estrogénmi bolo ukázané aj u hospodárskych zvierat a človeka (P r e s t o n, 1975; D a v i s a i., 1977; D e -

v e s a i., 1991). Telesný rast môže výrazne ovplyvniť aj priamy efekt estrogénov v rastúcom tkanive, napr. v tukovom tkanive (W a d e a G r a y , 1978; R a m i - r e z , 1981). Navyše, súčasné práce (u psov, králikov, potkanov i ľudí) naznačujú, že je možné aj priame ovplyvnenie longitudinálneho rastu dlhej kosti estrogénmi (Y o u n g a S t a c k , 1982; D a y a n i a i., 1988; Š ō m j e n a i., 1991; B l a n c h a r d a i., 1991).

V našom experimente dosiahli ovariektomované samice signifikantne väčšiu dĺžku tŕbie ako intaktné samice tak v 60. ako aj v 130. dni života, avšak rýchlosť longitudinálneho rastu tŕbie bola u ovariektomovaných samíc vyššia len v prvom sledovanom období. Výsledky tejto práce teda naznačujú, že skeletálny rast ovariektomovaných samíc potkana je intenzívnejší ako u intaktných samíc len určitý čas po ovariektómii a to približne v období, keď možno u týchto zvierat zaznamenať zvýšené prírastky telesnej hmotnosti.

Literatúra

- BLANCHARD, O. - TSAGRIS, L. - RAPPAPORT, R. - DUVAL-BEAUPERE, G. - CORVOL, M.: Age-dependent responsiveness of rabbit and human cartilage cells to sex steroids in vitro. *J. Steroid Biochem. molec. Biol.*, 40, 1991, s. 711-716.
- CASTRO-VAZQUEZ, A. - OJEDA, S. R. - KRULICH, L. - MCCANN, S. M.: TSH release during the estrous cycle of the rat: Variations in responsiveness to cervicovaginal stimulation. *Neuroendocrinology*, 33, 1981, s. 193-198.
- CLARK, R. G. - TARTTELIN, M. F.: Some effects of ovariectomy and estrogen replacement on body composition in the rat. *Physiol. and Behav.*, 28, 1982, s. 963-969.
- COYNE, M. D. - KITAY, J. I.: Effect of ovariectomy on pituitary secretion of ACTH. *Endocrinology*, 85, 1969, s. 1097-1102.
- ČÍKOŠ, Š. - KUCHAR, S. - KOPPEL, J.: The effect of administration of estradiol and testosterone on body growth of young male rats. *Physiol. Res.*, 41, 1992, s. 387-392.
- D'ANGELO, S. A. - FISHER, J. S.: Influence of estrogen on the pituitary - thyroid system of the female rat: mechanisms and loci of action. *Endocrinology*, 84, 1969, s. 117-122.
- DAVIS, S. T. - OHLSON, D. L. - KLINDT, J. - ANFINSON, M. S.: Episodic growth hormone secretory patterns in sheep: relationship to gonadal steroid hormones. *Amer. J. Physiol.*, 233, 1977, s. E519-E523.
- DAYANI, N. - CORVOL, M. T. - ROBEL, P. - EYCHENNE, B. - MONCHARMONT, B. - TSAGRIS, L. - RAPPAPORT, R.: Estrogen receptors in cultured rabbit articular chondrocytes: influence of age. *J. Steroid Biochem.*, 31, 1988, s. 351-356.
- DEVESA, J. - LOIS, N. - ARCE, V. - DIAZ, M. J. - LIMA, L. - TRESGUERRES, J. A. F.: The role of sexual steroids in the modulation of growth hormone (GH) secretion in humans. *J. Steroid Biochem. molec. Biol.*, 40, 1991, s. 165-173.
- FORD, J. J. - KLINDT, J.: Sexual differentiation and growth process. In: CAMPION, D. R. - HAUSMAN, G. J. - MARTIN, R. J. (eds): *Animal growth regulation*. New York and London, Plenum Press 1989, s. 317-332.
- GALBRAITH, H. - TOPPS, J. H.: Effect of hormones on the growth and body composition of animals. *Nutr. Abstr.*, R. B, 51, 1981, s. 521-540.
- GENTRY, R. T. - WADE, G. N.: Androgenic control of food intake and body weight in male rats. *J. comp. Physiol. Psychol.*, 90, 1976, s. 18-25.

- GRUNT, J. A.: Effects of adrenalectomy and gonadectomy on growth and development in the rat. *Endocrinology*, 75, 1964, s. 446-451.
- HANSSON, L. L.: Daily growth in length of diaphysis measured by oxytetracycline in rabbit normally and after medullary plugging. *Acta Orthop. scand. Suppl.*, 101, 1967.
- JANSSON, J. O. - EDÉN, S. - ISAKSSON, O.: Sites of action of testosterone and estradiol on longitudinal bone growth. *Amer. J. Physiol.*, 244 (Endocrin. Metab., 7), 1983, s. E135-E140.
- JANSSON, J. O. - FROHMAN, L. A.: Inhibitory effect of the ovaries on neonatal androgen imprinting of growth hormone secretion in female rats. *Endocrinology*, 121, 1987, s. 1417-1423.
- KAKOLEWSKI, J. W. - COX, V. C. - VALENSTEIN, E. S.: Sex differences in body weight - change following gonadectomy of rats. *Psychol. Reports.*, 22, 1968, s. 547-554.
- McELROY, J. F. - WADE, G. N.: Short- and long-term effects of ovariectomy on food intake, body weight, carcass composition, and brown adipose tissue in rats. *Physiol. and Behav.*, 39, 1987, s. 361-365.
- MODE, A. - GUSTAFSSON, J. A. - JANSSON, J. O. - EDÉN, S. - ISAKSSON, O.: Association between plasma level of growth hormone and sex differentiation of hepatic steroid metabolism in the rat. *Endocrinology*, 111, 1982, s. 1692-1697.
- PRESTON, R. L.: Biological responses to estrogen additives in meat producing cattle and lambs. *J. animal Sci.*, 41, 1975, s. 1414-1419.
- RAMIREZ, I.: Estradiol-induced changes in lipoprotein lipase, eating, and body weight in rats. *Amer. J. Physiol.*, 240 (Endocrin. Metab., 3), 1981, s. E533-E538.
- ROY, E. J. - WADE, G. N.: Role of food intake in estradiol-induced body weight changes in female rats. *Horm. and Behav.*, 8, 1977, s. 265-274.
- SLOB, A. K. - VAN DER WERFF TEN BOSCH, J. J.: Sex differences in body growth in the rat. *Physiol. and Behav.*, 14, 1975, s. 353-361.
- SÖMJEN, D. - WEISMAN, Y. - MOR, Z. - HARELL, A. - KAYE, A. M.: Regulation of proliferation of rat cartilage and bone by sex steroid hormones. *J. Steroid Biochem. molec. Biol.*, 40, 1991, s. 717-723.
- WADE, G. N. - GRAY, J. M.: Cytoplasmic 17β -[^3H] estradiol binding in rat adipose tissues. *Endocrinology*, 103, 1978, s. 1695-1701.
- WIEDEMANN, E.: Adrenal and gonadal steroids. In: DAUGHADAY, W. H. (ed.): *Endocrine control of growth*. New York, Elsevier 1981, s. 67-120.
- YOUNG, P. C. - STACK, M. L.: Estrogen and glucocorticoid receptors in adult canine articular cartilage. *Arthr. Rheum.*, 25, 1982, s. 568-573.

Došlo 25. 5. 1993

ČÍKOŠ, Š. - KUCHAR, S. - KOPPEL, J. (Institute of Animal Physiology, Slovak Academy of Sciences, Košice):

The body weight and skeletal growth of female rats after ovariectomy.

Vet. Med. - Czech, 38, 1993 (12): 729-737.

The body weight gain and growth of tail and tibia were investigated in ovariectomized female rats to ascertain whether the increased skeletal growth after ovariectomy takes place at the same time as the increased body weight gain.

Female rats were ovariectomized on the 30th day of age; half of them was killed on the 60th day of age and the other half was killed on the 130th day of age. The body

weight and tail length were significantly higher in the ovariectomized females than in intact females from the 60th day of age (Figs. 1, 2). The ovariectomized animals had higher body weight gain and tail length increment, in comparison with intact animals, mainly between the 40th and 60th day of age (Tabs. I, II). After the 90th day of age the body weight gain and tail length increment were no longer significantly higher in ovariectomized animals than in intact animals, although the ovariectomized females maintained the significantly higher body weight and tail length till the end of the experiment (130th day of age). The length of tibia was larger in ovariectomized animals if compared with controls, on the 60th as well as on the 130th day of age. However, the rate of longitudinal growth of tibia, measured (by tetracycline method) between the 57th and 59th day and between the 127th and 129th day of age, was significantly higher in ovariectomized animals only in the first period of measurement (Tab. III). The results suggest that changes in body weight gain after ovariectomy are parallel to the changes of skeletal growth - they are higher for a short time after ovariectomy and later they return to the level of intact females.

rat; ovariectomy; skeletal growth; body weight

Contact Address:

RNDr. Štefan Č í k o š , Ústav fyziológie hospodárskych zvierat SAV, Palackého 12,
040 01 Košice, Slovak Republic
Tel. 095 36251, fax 095 24491

**Ústav zemědělských a potravinářských informací
Slezská 7, 120 56 Praha 2**

**UPOZORNĚNÍ PRO ODBĚRATELE
VĚDECKÝCH ČASOPISŮ ČAZV A SAPV**

Od roku 1994 bude zajišťovat distribuci vědeckých časopisů vydavatel
- Ústav zemědělských a potravinářských informací Praha.

Věříme, že i v dalších letech zůstanete odběrateli našeho vědeckého
časopisu, a proto Vás žádáme, abyste nám

co nejdříve zaslali objednávku
na předplatné časopisu,
který budete v roce 1994 odebírat.

	Periodicita	Rozsah	Předplatné
Rostlinná výroba	12	96 s.	420,-
Živočišná výroba	12	96 s.	420,-
Veterinární medicína	12	64 s.	360,-
Zemědělská ekonomika	12	96 s.	420,-
Lesnictví	12	48 s.	420,-
Potravinářské vědy	6	80 s.	192,-
Zemědělská technika	4	80 s.	128,-
Ochrana rostlin	4	80 s.	128,-
Genetika a šlechtění	4	80 s.	128,-
Zahradnictví	4	80 s.	128,-

Objednávky zasílejte na adresu:

Ústav zemědělských a potravinářských informací
referát odbytu - pí Tejšková
Slezská 7
120 56 Praha 2

PŘEHLEDNÝ REFERÁT

CYTOCHROMY P450: TOXIKOLOGICKÝ VÝZNAM STANOVENÍ JEJICH HLADIN

M. Machala

Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno

Xenobiotika (léčiva, pesticidy, průmyslové kontaminanty, aditiva potravin nebo „přírodní“ pesticidy vyskytující se v rostlinách) podléhají v organismu detoxikačním reakcím, především monooxygenacím a následným konjugacím. Paradoxem metabolismu cizorodých látek je, že stejný enzymový systém může produkovat tzv. „metabolickou aktivaci“ nebo „bioaktivaci“ reaktivní metabolity, které způsobují vlastní manifestaci toxických, karcinogenních a dalších negativních účinků xenobiotik (P a r k e aj., 1990a).

Nepochybně nejdůležitějšími enzymy v metabolismu cizorodých látek jsou monooxygenázové systémy, které nalezneme v živočišné, rostlinné i mikrobiální říši. U savců se vyskytují v endoplazmatickém retikulu (po izolaci buněčných komponent v tzv. mikrosomech) jater, ale v menší míře i v jiných tkáních. Hydroxylací, demethylací, dealkylací, epoxidací, sulfoxidací a dalšími monooxygenázovými reakcemi je do molekuly cizorodé látky inkorporován jeden atom kyslíku; metabolity, které jsou zpravidla méně lipofilní (ale ne vždy biologicky neaktivní), jsou následnými konjugacími reakcemi s glutathionem, kyselinou glukuronovou, sulfátem atd. převedeny do takové chemické podoby, že je organismus schopen jejich exkrece (J a k o b y, 1980).

Centrální enzymy monooxygenace, cytochromy P450, jsou skupinou hemoproteinů, které zredukovány a v komplexu s oxidem uhelnatým dávají charakteristické absorpční spektrum s maximem okolo 450 nm (O m u r a a S a t o, 1964). Cytochromy P450 mají širokou substrátovou specifitu a kromě dnes už obrovského množství xenobiotik, strukturně si vzájemně nepodobných, metabolizují v organismu řadu endogenních látek jako steroidy, mastné a žlučové kyseliny, prostaglandiny (A s t r ö m a D e P i e r r e, 1986). Výzkum cytochromů P450 zvláště ve vztahu k vysoce toxickým aromatickým kontaminantům životního prostředí má také své aspekty praktické. Zahrnuje zkoumání metabolismu cizorodých látek, mechanismů toxicity, karcinogeneze, ale také možnosti biochemického monitorování kontaminantů a predikce potenciálu toxicity léčiv, agrochemikálií a dalších xenobiotik (S a f e aj., 1989; P a r k e aj., 1990a; L u b e t aj., 1992).

KLASIFIKACE A INDUKCE JATERNÍCH MIKROSOMÁLNÍCH CYTOCHROMŮ P450

Enzymologickými a zvláště molekulárně biologickými metodami byla získána data strukturních homologií jednotlivých forem P450, umožňující zavést obecnou nomenklaturu genů a proteinů P450 (N e b e r t aj., 1991). Do roku 1990 bylo popsáno celkem 154 genů P450, které byly rozděleny do 27 genových „rodin“, z nichž 10 existuje u savců. Z hlediska cizo-

rodých látek jsou významné čtyři rodiny: P450IA (podle nového označení P450IA nebo CYP1A), P450II (především „podrodiny“ IIB a IIE), P450IIIA a P450IV. Jednotlivé formy P450 mají separátní regulační kontrolu a různé skupiny cizorodých látek odlišně indukují (nebo v některých případech snižují) jejich hladinu. Polycyklické aromatické uhlovodíky s mutagenními a karcinogenními účinky (3-metylcholantren, benzo[a]pyren, dibenzo[a,h]antracen) a některé polyhalogenované bifenyly (PCB), dibenzo-p-dioxiny a dibenzofurany (např. 3,3',4,4',5-pentachlorbifenylyl a 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxin) jsou induktory cytochromu P450IA1 a IA2, arylaminy indukují především P450IA2; fenobarbital, řada dalších farmak a kontaminantů (DDT, nekoplanární PCB) zvyšují hladinu P450IIB; P450IIE1 je inducibilní po podání acetonu, etanolu nebo benzenu, dexametazon a jiné objemné molekuly indukují cytochromy P450 ze skupiny IIIA a dialkylestery kyseliny ftalové jsou induktory P450IV (Parkinson aj., 1983; Johansson aj., 1988; Namkung aj., 1988; Okita a Okita, 1992). Indukce nejsou zcela specifické (aceton indukuje také P450IIB1 a fenobarbital cytochromy P450IIB, IIE i IIIA), přesto stanovením zvýšených hladin P450 lze určit typ induktoru a odhadnout mechanismus detoxikace, popř. aktivace. Přehled induktorů P450 obsahuje tab. I.

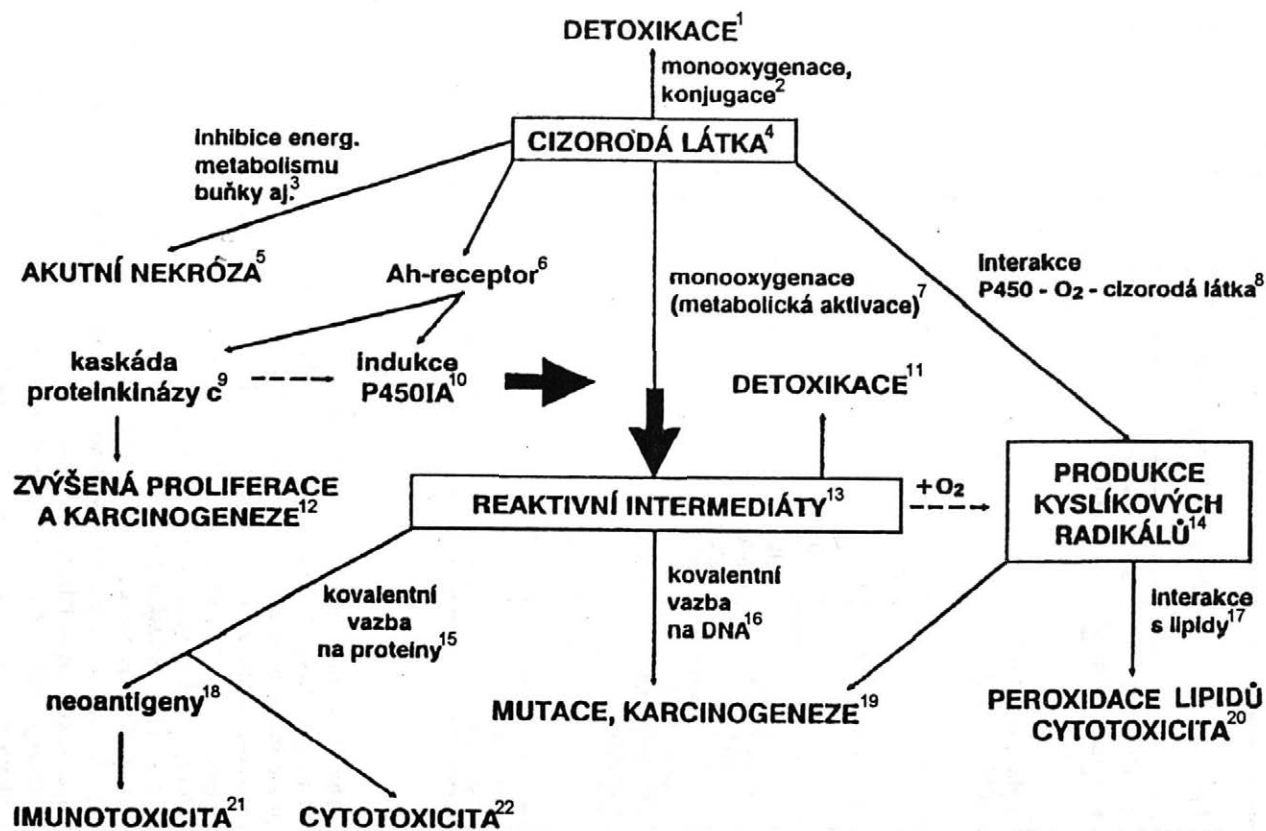
ROLE CYTOCHROMU P450 V CHEMICKÉ TOXICITĚ A KARCINOGENITĚ

Schématické znázornění dějů probíhajících při expresi toxických a dalších negativních efektů cizorodých látek v organismu je shrnuto na obr. 1. Kromě přímého inhibičního účinku některých látek na důležité enzymové systémy, např. kyanidu na cytochromoxidázu, je chemická toxicita a karcinogenita vyvolávána po metabolické aktivaci. V několika případech byla popsána bioaktivace redukcí (např. azosloučeniny jsou nejprve redukovány na aromatické aminy a ty dále aktivovány monooxygenací na toxické hydroxylaminy), konjugací nebo oxidací flavinmonooxygenázou, prostaglandin-H-syntázou nebo jinou peroxidázou (Larsson aj., 1988), ale hlavní cestou, která vede k mutacím a karcinomům, jsou monooxygenázové reakce, mediované cytochromy P450, především P450IA1 a IA2 (Parke, 1987; Parke aj., 1990a). Vznikající reaktivní metabolity se váží na životně důležité buněčné makromolekuly za vzniku mutací, karcinogeneze, cytotoxicity, imunotoxicity, popř. dalších efektů (obr. 1). Dnes jsou popisovány přinejmenším tři následné procesy probíhající během chemické karcinogeneze:

- bioaktivace prokarcinogenů na reaktivní metabolity,
- vznik aduktů reaktivních metabolitů s makromolekulami, především DNA (a pravděpodobně zásah do DNA-reparačních procesů)
- fixace změn DNA a onkogenní aktivace.

Metabolická aktivace je tedy iniciačním krokem v chemické karcinogenezi (Kawajiti a Fujii-Kuriyama, 1991).

Většina chemických karcinogenů je u savců aktivována pouze omezeným počtem cytochromů P450: IA1, IA2, IIE1 a IIIA (tab. I). Zatímco P450IIE aktivuje dialkylitrosaminy a cytochromy P450IIIA aflatoxin B1, dihydrodioly benzo[a]pyrenu a některé další cizorodé látky, cytochrom P450IA1-dependentní monooxygenace jsou zodpovědné za bioaktivaci velkého počtu xenobiotik: epoxidace polycyklických aromatických uhlovodíků, N-hydroxylace aromatických aminů (4-aminobifenyly, 2-naftylaminu, heterocyklických aromatických aminů, vznikajících během pyrolýzy proteinů a aminokyselin, jako je Glu-P-1) atd. Cytochrom P450IA1 metabolizuje planární molekuly (např. polycyklické aromatické uhlovodíky) většinou v pozicích, které jsou obtížně dostupné pro konjugací enzymy a pro epoxidhydrolázu, jejímiž substráty jsou arenepoxydy (Ioannides aj., 1984), a vzniká tak značné množství reaktivních metabolitů. Cizorodé látky indukující P450IA se v cytosolu váží na specifický Ah



1. Chemická toxicita a karcinogeneze (podle Parke, 1987; Ioannides aj., 1990, upraveno) – Chemical toxicity and carcinogenesis (ref. Parke, 1987; Ioannides et al., 1990, modified)

¹detoxication; ²monooxygenation, conjugation; ³inhibition of cell energy metabolism etc.; ⁴xenobiotic; ⁵acute necrosis; ⁶Ah-receptor; ⁷monooxygenation (metabolic activation); ⁸P450-O₂-xenobiotic interaction; ⁹protein kinase c cascade; ¹⁰P450IA induction; ¹¹detoxication; ¹²increased proliferation and carcinogenesis; ¹³reactive intermediates; ¹⁴production of oxygen radicals; ¹⁵covalent bond to proteins; ¹⁶covalent bond to DNA; ¹⁷interaction with lipids; ¹⁸neoantigens; ¹⁹mutations, carcinogenesis; ²⁰lipid peroxidation, cytotoxicity; ²¹immunotoxicity; ²²cytotoxicity

I. Nejdůležitější formy kryších a lidských cytochromů P450, které se účastní bioaktivace cizorodých látek a porušení kyslíkových radikálů (ref. Guengerich, 1990; Parke aj., 1990b; Souček a Gut, 1992; Kawajiri a Fujii-Kuriyama, 1991)

Kryší formy P450	Lidské formy P450	Induktory	Aktivovaná xenobiotika	Specificky katalyzovaná reakce
1A1	1A1	TCDD, PAH, koplánární PCB atd.	PAH, arylaminy, (AFB ₁) atd.	7-etoxyresorufin-O-deetyláza
1A2	1A2	arylaminy (4ABP, GLU-P-1 atd.)	4ABP, Glu-P-1 atd.	Glu-P-1-N-hydroxyláza, kofein-N ₃ -demetyláza, fenacetin-O-deetyláza (7-metoxyresorufin-O-demetyláza)
2B1	2B6	fenobarbital DDT	(PAH), (AFB ₁), za přítomnosti PB, DDT, dieldrinu produkce kyslíkových radikálů	7-pentoxyresorufin-O-dealkyláza, (amino-pyrim-N-demetyláza)
2E1	2E1	etanol, aceton, benzen	dialkylnitrosaminy, produkce kyslíkových radikálů	p-nitrofenolhydroxyláza, dimethylnitrosamin-N-demetyláza
3A1	3A3	dexametazon (částečně fenobarbital)	AFB ₁	erytromycin-N-demetyláza
-	3A4		AFB ₁ , arylamin IQ, benzpyren-7,8-diol	nifedipin-N-oxidáza
4A1	4A9	clofibrate, dialkylftaláty	tvorba H ₂ O ₂ , peroxisomální proliferace	laurát-12-hydroxyláza

receptor, který zahajuje indukcí P450IA a aktivuje se také kaskáda proteinkinázy c (Landers a Bunce, 1991; Carrier aj., 1992). Proteinkináza c zvyšuje buněčné dělení, a tím nepřímo mutagenézi a karcinogenézi, protože adukty reaktivních metabolitů s DNA jsou přeměňovány na mutace během buněčného dělení; dělíci se buňky jsou ve větším riziku než buňky klidové (Ames, 1992). V poslední době byla také prokázána účast proteinkinázy c na indukcí P450IA1 (Carrier aj., 1992).

Cizorodé látky s vysokou indukční schopností mění v organismu poměr detoxikačních a bioaktivacích dějů změnou hladin některých forem P450 (Parke aj., 1990a). To je právě případ indukce P450IA látkami typu 2,3,7,8-tetrachlordibenzo-p-dioxinu (TCDD), které mohou způsobit výrazné zvýšení metabolické aktivity dalších xenobiotik přítomných v organismu (tzv. „kokarcinogenézi“). Vlastní toxický účinek TCDD a strukturně příbuzných perzistentních aromatů není dosud přesně určen. Jedná se zřejmě o komplexní procesy (Landers a Bunce, 1991), jejichž podstatnou součástí je i vazba na Ah receptor a indukce P450IA. Podle jedné hypotézy je indukcí P450 zvýšena hydroxylace kyseliny arachidonové v buněčných membránách na toxické epoxidy a monohydroxyeikosatetraenové

- The most important rat and human cytochromes P450 involved in bioactivation of xenobiotics and in a production of oxygen radicals

Rat forms P450	Human forms P450	Inductors	Activated xenobiotics	Specifically catalyzed reaction
1A1	1A1	TCDD, PAH, coplanar PCB, etc.	PAH, arylamines, (AFB ₁), etc.	7-ethoxyresorufin O-deethylase
1A2	1A2	arylamines (4ABP, Glu-P-1, etc.)	4ABP, Glu-P-1, etc.	Glu-P-1 N-hydrolase, caffeine N ₃ -demethylase, phenacetin O-deethylase, (7-methoxyresorufin O-demethylase),
2B1	2B6	phenobarbital, DDT	(PAH), (AFB ₁), in presence of PB, DDT, dieldrin production of oxygen radicals	7-pentoxyresorufin O-dealkylase, (aminopyrine-N-demethylase),
2E1	2E1	ethanol, acetone, benzene	dialkyl nitrosamines, production of oxygen radicals	p-nitrophenol hydrolase, dimethyl-nitrosamine N-demethylase
3A1	3A3	dexamethasone (partly phenobarbital)	AFB ₁	erythromycin N-demethylase
-	3A4		AFB ₁ , arylamine IQ, benzpyrene-7,8-diol	nifedipin N-oxidase
4A1	4A9	clofibrate, dialkyl phthalates	H ₂ O ₂ production, peroxisomal proliferation	laurate 12-hydroxylase

kyseliny a je tak porušena integrita membrán (Rifkind aj., 1990), TCDD však pravděpodobně zasahuje více buněčných funkcí.

Cytochromy P450 mohou mít ještě další úlohu v chemické toxicitě - v produkci vysoce toxických kyslíkových radikálů. První funkcí v katalytickém cyklu P450 je aktivace kyslíku, aby mohlo dojít k rozštěpení vazby O-O a vlastní monooxygenaci. Látky, které jsou metabolizovány jen obtížně, se naváží na cytochrom P450 a uvedou jej do tzv. vysokospinového stavu; poté se naváže a je aktivován kyslík a pokud probíhají další kroky (monooxygenace substrátu) velmi pomalu, většina aktivovaného kyslíku se přeměňuje na superoxid a ten na vysoce toxický hydroxylový radikál (Parks aj., 1990a). Takový mechanismus probíhá při interakcích P450IIB1 s fenobarbitalem, DDT nebo dieldrinem. Podobný efekt má i rozpojení P450 a P450-reduktázy obtížně metabolizovatelnými lipofilními látkami, které se mohou akumulovat v endoplazmatickém retikulu, měnit membránovou fluiditu a rozpojit elektronový tok. Nejduležitější z hlediska generování kyslíkových radikálů je cytochrom P450IIE1, který je i v základním stavu (bez navázání substrátu) ve vysokospinovém stavu. Cytochromy P450IV

se přímo neúčastní bioaktivace, jsou však spojeny s proliferací peroxisomů a produkují peroxid vodíku (Gibson, 1989).

Ačkoliv byly popsány ještě další procesy, které vedou k produkci reaktivních intermediátů a kyslíkových radikálů (např. jednoelektronové přechody chinonů za účasti flavoproteinové oxidoreduktázy), lze říci, že vhodným výběrem živočišných druhů, dávek xenobiotik a specifického stanovení cytochromů P450 (enzymologicky, imunochemicky nebo molekulárně biologickými technikami) můžeme odhadnout metabolické dráhy a rizika spojená s bioaktivací. Vysoké korelace mezi P450IA1-indukční potencí planárních polyaromatických kontaminantů a jejich toxickými a dalšími negativními efekty umožnily také vývoj metod biochemického monitorování těchto kontaminantů v životním prostředí.

VYUŽITÍ MONOOXYGENÁZOVÉHO SYSTÉMU PRO BIOCHEMICKÉ MONITOROVÁNÍ KONTAMINACE ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ

Instrumentace analytických metod stanovení organických kontaminantů životního prostředí v posledních letech výrazně pokročila. Přesto k určení toxikologického rizika jakékoliv směsi těchto látek, především polyhalogenovaných bifenyly, naftalenů, dibenzo-p-dioxinů, dibenzofuranů, fenolů a dalších polutantů, je nezbytné vypracovat nové přístupy. Je to dáno komplexním charakterem vzorků z životního prostředí, relativním nedostatkem toxikologických informací o účinku některých závažných kontaminantů, některými analytickými (separačními) problémy a také tím, že řada průmyslových kontaminantů je analyticky sledována jen minimálně (Safe aj., 1989).

Od konce 70. let byla zjišťována dobrá korelace mezi mohutností indukce P450IA1-dependentní monooxygenázové aktivity (stanovené jako benzo[a]pyrenhydroxyláza nebo 7-etoxyresorufin-O-deetyláza) jednotlivými „kongenery“ polychlorovaných bifenyly, dibenzo-p-dioxinů a dibenzofuranů a jejich toxicitou (Poland aj., 1979; Bradlaw a Casterline, 1979; Sawyer a Safe, 1982; Sawyer aj., 1983). Leece aj. (1985) naměřili dobré korelace mezi indukčními testy *in vivo* (v jaterních mikrosomech kryš) a *in vitro* (v kryších hepatoma buňkách H4IIE). Tyto studie, spolu se stanovením vazby kontaminantu na cytosolový Ah receptor a několika dalšími metodami, se staly základem pro tabelování tzv. faktoru ekvivalentní toxicity (toxicity equivalency factor, TEF), což je hodnota toxicity kongeneru nebo komplexní směsi vztažená k referenčnímu induktoru TCDD. Při určování rizika toxických cizorodých látek v životním prostředí lze také užít analytického stanovení jednotlivých kongenerů uvedených kontaminantů a tabelovaných hodnot TEF k výpočtu „TCDD-ekvivalentů“ (U.S.EPA, 1989). Kanna aj. (1988) z těchto výpočtů jednoznačně zjistili, že vzhledem k relativně vysokým hladinám mono-o-chlorovaných PCB jsou tyto kongenery nejzávažnějšími kontaminanty, přestože jejich indukční (a toxická) potence je nižší než u koplárních PCB nebo TCDD. Hodnoty TEF byly mezinárodně sjednoceny a oficiálně uznány v USA, Kanadě, Velké Británii, severských zemích a v Nizozemsku (Kutz aj., 1990). Vzhledem k zjištěným synergickým i antagonickým efektům směsí kongenerů při indukci P450IA1 je však biologické stanovení TCDD-toxicity mnohem přesnější (Hutzinger aj., 1981; Bannister aj., 1987).

Stanovení *in vitro* v kryších hepatoma buňkách H4IIE bylo užito pro určení toxicity TCDD-typu v různorodých vzorcích životního prostředí (Tillitt aj., 1991; Ankley aj., 1991). Hanberg aj. (1991) zjistili, že polychlorované naftaleny mají indukční potenci srovnatelnou s koplárnými PCB a také komerční směs polybromovaných difenyléterů vykazovala v tomto systému aktivitu. Další práce používaly myší hepatoma buňky Hepa-1 pro stanovení indukce cytochromu P450IA1 v popílku (Koppnen aj., 1991) a byly testovány také lidské hepatoma buněčné kultury (Lipp aj., 1992). Indukce 7-etoxyresorufin-O-deetylázy

v jiném modelovém systému, v kuřecím embryu, prokázala relativně silnou indukci polycyklických aromatických uhlovodíků přítomných ve vzorcích říčních sedimentů s nízkým obsahem PCB a dibenzo-p-dioxinů (M a c h a l a aj., 1992).

Polycyklické aromatické uhlovodíky a PCB, které jsou přítomny v sedimentech, mohou indukovat cytochrom P450IA-dependentní monoxygenázy a tím i vznik karcinogeneze a další chorobné procesy u vodních živočichů (S t e g e m a n a L e c h, 1991). Indukce těchto aktivit u ryb může indikovat expozici těmito kontaminanty. Enzymologické nebo imunochemické stanovení indukovaných hladin P450 může být další vhodnou metodou biologického monitorování kontaminace (M o n o d aj., 1988; S t e g e m a n a L e c h, 1991). Stanovení nemusí být omezeno jen na vodní živočichy, jak prokázali L u b e t aj. (1992).

STANOVENÍ POTENCIÁLU TOXICITY XENOBIOTIK

Cytochromy P450, které se účastní metabolické aktivace xenobiotik, jsou v játrech, případně v dalších tkáních přítomny ve velmi nízkých hladinách a malá množství vytvořených reaktivních intermediátů jsou snadno deaktivována konjugacími enzymy nebo enzymy a metabolity celulární ochrany před radikály (R e d, 1985). Charakteristickou vlastností většiny chemických toxinů a karcinogenů je, že mohou stimulovat systém cytochromu P450 a že indukují ty formy P450, jež se účastní jejich bioaktivity. Schopnost cizorodé látky indukovat svou vlastní aktivaci může být jedním z nejdůležitějších faktorů při určování jejího toxického a karcinogenního potenciálu (P a r k e aj., 1990b). Na tomto principu je možné navrhnout rychlý test odhadu rizika chemické látky, založený na interakcích testovaného xenobiotika s mechanismy regulace hladin cytochromů P450. Indukce je indikativní pro určitý cytochrom P450 a pro určitý mechanismus toxického účinku. Z výsledků indukce lze předpovídat potenciální toxicitu a karcinogenitu (P a r k e, 1990).

Z tab. I vyplývá, které formy P450 je nutno stanovit. Cytochromy P450IA1 a IA2 jsou zodpovědné za aktivaci většiny známých karcinogenů a jejich indukce je důležitý parametr pro určení potenciálního rizika xenobiotik. Vhodnější je však stanovit také hladinu P450IIE, P450IIB, P450IIIA, P450IVA, popř. dalších enzymů biotransformace a celulární ochrany před reaktivními intermediáty nebo stanovení enzymových aktivit kombinovat s běžnými testy mutagenity. Jestliže je látka genotoxická v krátkodobých testech, kde je použit vysoce aktivovaný P450IA systém, ale je neschopna tento enzymový systém indukovat *in vivo*, pravděpodobně nebude karcinogenní (P a r k e aj., 1990a). Pro stanovení jednotlivých forem cytochromu P450 se nejčastěji používá měření jejich enzymových aktivit nebo, jsou-li k dispozici, imunochemické techniky, i když se indukce xenobiotiky i substrátové specifity jednotlivých cytochromů P450 překrývají, např. pro N-hydroxylace arylaminů (A y r t o n aj., 1990).

Testy založené na stanovení indukce 7-etoxyresorufin- a 7-pentoxy-O-dealkylázy, Glu-P-1-N-hydroxylázy, dimetylnitrosamin-N-demetylázy, erytromycin-N-demetylázy a laurát-12-hydroxylázy v krysích jaterních mikrosomech použili P a r k e aj. (1990a). Jako alternativní modelový systém byl testován v naší laboratoři jaterní mikrosomální systém kuřecího embrya. Ukázala se vysoká indukce cytochromu P450IA a systém je vhodný také pro stanovení indukce fenobarbitalového typu. Naopak cytochromy P450, indukované u savců etanolem nebo dexametasonem, nejsou pravděpodobně v kuřecím embryu přítomny. To na jedné straně limituje možnosti testování, na druhé straně však jsou indukce vysoce specifické (M a c h a l a aj., 1993).

DISKUSE

Většina informací o interakcích P450, metabolické aktivaci a mechanismech toxických účinků cizorodých látek pochází z modelových pokusů s hlodavci. To v sobě skrývá problémy,

jak mezidruhově extrapolovat výsledky. Byly nalezeny rozdíly v odpovědi (indukce, tum-over) u různých živočišných druhů, které jsou dány rozdílnými soubory cytochromů P450 (N e b e r t aj., 1991). Malí savci (krysy, myši) mají vysoké rychlosti bazálního metabolismu, vysoké hladiny kyslíku v tkáních a naopak vysoký potenciál pro karcinogenitu. Hladiny P450 také závisí na věku (vývojovém stadiu), pohlaví, dietě a dalších faktorech (I w a s a k i aj., 1986). To se týká především lidské populace, u níž přistupuje ještě genetický polymorfismus a dietní návyky (G u e n g e r i c h , 1992). Zvířecí modely také nejsou schopny předpovídat vznik neoantigenů a imunotoxicity u člověka (P a r k e , 1990).

Na druhé straně je však třeba zdůraznit, že byly formulovány obecné mechanismy bioaktivních procesů. Stanovení toxicity TCDD-typu v modelovém biologickém systému, které je nejvíce studováno, patří do souboru uznaných metod, např. v USA a ve Švédsku (K u t z aj., 1990; H a n b e r g aj., 1991). Evolučně jsou geny P450IA velmi staré a jeho ortologní proteiny nalezneme u ryb, které jsou vhodnými reprezentanty pro zavedení cíleného biochemického monitorování kontaminace aromatickými polutanty. Cytochromy P450IA, P450IIB, P450IIE a P450IIIA jsou přítomny u savců a přestože aminokyselinové sekvence proteinů P450 jsou rozdílné u různých živočišných druhů, konzervace funkcí cytochromů P450 ve fylogenezi je zjevně vysoká, jak ukázala práce s formami cytochromu P450 v kuřecích játrech mikrosomech indukovanými acetonem (S i n c l a i r aj., 1990). U jednotlivých forem P450, purifikovaných z různých živočišných druhů, byly nalezeny analogické bioaktivní aktivity (tab. I). Biochemické metody stanovení kontaminace toxickými látkami TCDD-typu i určení potenciální toxicity a karcinogenity poskytují důležitá toxikologická data. Tvoří se tak celkem nové spektrum metod pro screening vysoce toxických aromatických kontaminantů a pro relativně rychlé a levné testy odhadu toxicity a formulování mechanismů detoxikace a bioaktivity.

ZÁVĚR

Velmi málo je známo o monooxygenázových systémech u hospodářských zvířat. Molekulárně biologickými metodami byly charakterizovány jen bovinní a prasečí cytochromy P450XI, XXVII a XIX, které se účastní metabolismu steroidů (N e b e r t aj., 1991), a monooxygenázové aktivity zúčastněné na metabolismu xenobiotik byly měřeny u krav, ovcí a prasat nesystematicky (S m i t h aj., 1984; D a l v i aj., 1987). Také nebyly stanoveny hladiny těchto enzymů po interakcích s xenobiotiky. Je nezbytné rozvíjet nepřímou detekci kontaminace ekosystému (jako tzv. „early warning“ testy) ve vybraných species, ale výzkum musí být zaměřen i na detoxikační enzymy hospodářských zvířat a metabolické aktivace veterinárních léčiv a kontaminantů životního prostředí. Těmto tématům byla zatím věnována minimální pozornost, ačkoliv jsou konsekvence v karcinogenitě, imunotoxicitě a reprodukčních poruchách již dlouhou dobu pozorovány.

Rychlé a relativně levné testy, založené na stanovení hladin cytochromů P450, mohou být předrženy před dnes běžné procedury (jak screeningové stanovení toxicity TCDD-typu ve vzorcích z životního prostředí před analytické stanovení kontaminantů, tak testy toxického potenciálu xenobiotik před soubor toxikologických, farmakokinetických a dalších metod). V případě biochemického stanovení TCDD-toxicity se určí skutečná toxicita komplexní směsi včetně možných synergických a antagonických efektů a popř. přítomnosti kontaminantů, které nejsou analyticky sledovány.

Dnešní znalosti mechanismů exprese toxicity a dostupná data vztahů struktury a aktivity ukazují naprostou nutnost přehodnocení stávajícího systému analytického monitorování cizorodých látek. Na jedné straně existují toxikologicky významné agrochemikálie, průmyslové kontaminanty či dokonce toxické složky přirozené potravy, které nejsou v centru zájmu (chlo-

rované anilíny, naftaleny, „přirozené“ pesticidy atd.), na druhé straně se velký objem kontroly kontaminace nebo monitorování týká chlorovaných pesticidů, které jsou sice perzistentní, ale jejich toxicita je nižší a do životního prostředí nevstupují. Důležitá je i harmonizace s mezinárodními výzkumnými programy, doporučenými metodami a legislativními opatřeními.

Literatura

- AMES, B. N.: Pollution, pesticides, and cancer. *J. AOAC Int.*, 75, 1992, s. 1-5.
- ANKLEY, G. T. - TILLITT, D. E. - GIESY, J. P. - JONES, P. D. - VERBRUGGE, D. A.: Bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in PCB-containing extracts from the flesh and eggs of Lake Michigan chinook salmon and possible implications for reproduction. *Can. J. Fish. aquat. Sci.*, 48, 1991, s. 1685-1690.
- ASTRÖM, A. - DePIERRE, J. W.: Rat liver microsomal cytochrome P-450: purification, characterization, multiplicity and induction. *Biochem. biophys. Acta*, 853, 1986, s. 1-27.
- AYRTON, A. D. - McFARLANE, M. - WALKER, R. - NEVILLE, S. - IOANNIDES, C.: The induction of P450I proteins by aromatic amines may be related to their carcinogenic potential. *Carcinogenesis*, 11, 1990, s. 803-809.
- BANNISTER, R. - DAVIS, D. - ZACHAREWSKI, T. - TIZARD, I. - SAFE, S.: Aroclor 1254 as a 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin antagonist: Effects on enzyme induction and immunotoxicity. *Toxicology*, 46, 1987, s. 29-42.
- BRADLAW, J. A. - CASTERLINE, J. L.: Induction of enzyme activity in cell culture: A rapid screen for detection of planar polychlorinated organic compounds. *J. Assoc. off. analyt. Chem.*, 62, 1979, s. 904-916.
- CARRIER, F. - OWENS, R. A. - NEBERT, D. W. - PUGA, A.: Dioxin-dependent activation of murine Cyp1a-1 Gene Transcription requires protein kinase C-dependent phosphorylation. *Molec. cell. Biol.*, 12, 1992, s. 1856-1863.
- DALVI, R. R. - NUNN, V. A. - JUSKEVICH, J.: Hepatic cytochrome P-450 dependent drug metabolizing activity in rats, rabbits and several food-producing species. *J. veter. Pharmacol. Ther.*, 10, 1987, s. 164-168.
- GIBSON, G. G.: Comparative aspects of mammalian cytochrome P450 IV gene family. *Xenobiotica*, 19, 1989, s. 1123-1148.
- GUENGERICH, F. P.: Roles of cytochrome P-450 enzymes in chemical carcinogenesis and cancer therapy. *Cancer Res.*, 48, 1990, s. 2946-2954.
- GUENGERICH, F. P.: Human cytochrome P-450 enzymes. *Life Sci.*, 50, 1992, s. 1471-1478.
- HANBERG, A. - STAHLBERG, M. - GEORGELLIS, A. - DE WITT, C. - AHLBORG, U. G.: Swedish dioxin survey: Evaluation of the H-4-II E bioassay for screening environmental samples for dioxin-like enzyme induction. *Pharmacol. Toxicol.*, 69, 1991, s. 442-449.
- HUTZINGER, O. - OLIE, K. - LUSTENHOUWER, J. W. A. - OKEY, A. B. - BANDIERA, S. - SAFE, S.: Polychlorinated dibenzo-p-dioxins and dibenzofurans: A bioanalytical approach. *Chemosphere*, 10, 1981, s. 19-25.
- IOANNIDES, C. - LUM, P. Y. - PARKE, D. V.: Cytochrome P-448 and the activation of toxic chemicals and carcinogens. *Xenobiotica*, 14, 1984, s. 119-138.
- IOANNIDES, C. - BARNETT, C. R. - AYRTON, A. D. - FLATT, P. R.: Alterations of chemical toxicity in animal models of insulin-dependent diabetes. In: SHAFRIR, E. (ed.): *Frontiers in diabetes research VI*. 1990, s. 306-312.

- IWASAKI, K. - LUM, P. Y. - IOANNIDES, C. - PARKE, D. V.: Induction of cytochrome P-448 activity as exemplified by the O-deethylation of ethoxyresorufin. *Biochem. Pharmacol.*, 35, 1986, s. 3879-3884.
- JAKOBY, W. B. (ed.): Enzymatic basis of detoxication. Vol. I, II, New York, Academic Press 1980.
- JOHANSSON, I. - EKSTRÖM, G. - SCHOLTE, B. - PUZYCKI, D. - JÖRNVALL, H. - INGELMAN-SUNDBERG, M.: Ethanol-, fasting-, and acetone-inducible cytochromes P-450 in rat liver: Regulation and characteristics of enzymes belonging to the IIB and IIE gene subfamilies. *Biochemistry*, 27, 1988, s. 1925-1934.
- KANNAN, N. - TANABE, S. - TATSUKAWA, R.: Toxic potential of non-ortho and mono-ortho coplanar PCBs in commercial PCB preparations: „2,3,7,8-T4CDD toxicity equivalence factors approach“. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 41, 1988, s. 267-276.
- KAWAJIRI, K. - FUJII-KURIYAMA, Y.: P450 and human cancer. *Jap. Canc. Res.*, 82, 1991, s. 1325-1335.
- KOPPONEN, P. - TÖRRÖNEN, R. - TARHANEN, J. - RUUSKANEN, J. - KÄRENLAMP, S.: Cytochrome P450IA1 induction in mouse hepatoma cell culture as an indicator of polycyclic organic compounds in fly ash. *Chemosphere*, 22, 1991, s. 895-904.
- KUTZ, F. W. - BARNES, D. G. - BRETHAUER, E. W. - BOTTIMORE, D. P. - GREIM, H.: The international toxicity equivalency factor (I-TEF) method for estimating risks associated with exposures to complex mixtures of dioxins and related compounds. *Toxicol. Envir. Chem.*, 26, 1990, s. 99-109.
- LANDERS, J. P. - BUNCE, N. J.: The Ah receptor and the mechanism of dioxin toxicity. *Biochem. J.*, 276, 1991, s. 273-286.
- LARSSON, R. - BOUTIN, J. - MOLDEUS, P.: Peroxidase-catalyzed metabolic activation of xenobiotics. In: GORROD, J. W. - OELSCHLAGER, H. - CALDWELL, J. (eds.): *Metabolism of Xenobiotics*. London, Taylor & Francis 1988, s. 43-50.
- LEECE, B. - DENOMME, M. A. - TOWNER, R. - LI, S. M. A. - SAFE, S.: Polychlorinated biphenyls: Correlation between *in vivo* and *in vitro* quantitative structure-activity relationships (QSAR). *J. Toxicol. Envir. Hlth.*, 16, 1985, s. 379-388.
- LIPP, H. P. - SCHRENK, D. - WIESMULLER, T. - HAGENMAIER, H. - BOCK, K. W.: Assessment of biological activities of mixtures of polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs) and their constituents in human HepG2 cells. *Arch. Toxicol.*, 66, 1992, s. 220-223.
- LUBET, R. R. - NIMS, R. W. - BEEBE, L. E. - FOX, S. D. - ISAAQ, H. J. - MCBEE, K.: Induction of hepatic CYP1A activity as a biomarker for environmental exposure to Aroclor 1254 in feral rodents. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 22, 1992, s. 339-344.
- MACHALA, M. - ULRICH, R. - HOLOUBEK, I. - ČÁSLAVSKÝ, J. - KOČAN, A. - PETRÍK, J. - CHOVANCOVÁ, J. - BÍLIKOVÁ, K. - FILIP, F. - GAJDŮŠKOVÁ, V.: The effect of polycyclic aromatic hydrocarbons on the measurement of TCDD-like toxic potency in chick embryo livers. *Polycyclic Arom. Hydrocarbons*, 1992, č. 3, s. 1215-1222.
- MACHALA, M. - NEZVEDA, K. - ULRICH, R. - MÁTLOVÁ, L.: The measurement of toxicity potential of aromatic contaminants in chick embryo and their biochemical monitoring in environmental samples. In: RICHARDSON, M. L. (ed.): *Ecotoxicology monitoring*. VCH, Cambridge, 1993, s. 175-182.
- MONOD, G. - DEVAUX, A. - RIVIERE, J. L.: Effects of chemical pollution on the activities of hepatic xenobiotic metabolizing enzymes in fish from the river Rhone. *Sci. Total Envir.*, 73, 1988, s. 189-201.
- NAMKUNG, M. J. - YANG, H. L. - HULLA, J. E. - JUCHAU, M. R.: On the substrate specificity of cytochrome P450IIIa1. *Molec. Pharmacol.*, 34, 1988, s. 628-637.

- NEBERT, D. W. - NELSON, D. R. - COON, M. J. - ESTABROOK, R. W. - FEYEREISEN, R. - FUJII-KURIYAMA, Y. - GONZALES, F. J. - GUENGERICH, F. P. - GUNSALUS, I. C. - JOHNSTON, E. F. - LOPER, J. C. - SATO, R. - WATERMAN, M. R. - WAXMAN, D. J.: The P450 superfamily: Update on new sequences, gene mapping, and recommended nomenclature. *DNA cell. Biol.*, 10, 1991, s. 1-14.
- OKITA, R. T. - OKITA, J. R.: Characterization of a cytochrome P450 from di(2-ethylhexyl) phthalate-treated rats which hydroxylates fatty acids. *Arch. Biochem. Biophys.*, 294, 1992, s. 475-481.
- OMURA, T. - SATO, R.: The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *J. Biol. Chem.*, 239, 1964, s. 2370-2378.
- PARKE, D. V.: Activation mechanisms to chemical toxicity. *Arch. Toxicol.*, 60, 1987, s. 5-15.
- PARKE, D. V.: Drug metabolism in the design and safety evaluation of new drugs. *Acta Pharm. Nord.*, 2, 1990, s. 231-247.
- PARKE, D. V. - IOANNIDES, C. - LEWIS, D. F. V.: Computer modelling and *in vitro* tests in the safety evaluation of chemicals-strategic applications. *Toxic in vitro*, 4, 1990a, s. 680-685.
- PARKE, D. V. - IOANNIDES, C. - LEWIS, D. F. V.: The safety evaluation of drugs and chemicals by the use of computer optimised molecular parametric analysis of chemical toxicity. *ATLA*, 18, 1990b, s. 91-102.
- PARKINSON, A. - SAFE, S. H. - ROBERTSON, L. W. - THOMAS, P. E. - RYAN, D. E. - REIK, L. M. - LEVIN, W.: Immunochemical quantitation of cytochrome P-450 isozymes and epoxide hydrolase in liver microsomes from polychlorinated and polybrominated biphenyls: A study of structure-activity relationships. *J. Biol. Chem.*, 258, 1983, s. 5967-5976.
- POLAND, A. - GREENLEE, W. F. - KENDE, A. S.: Studies on the mechanism of action of the chlorinated dibenzo-p-dioxins and related compounds. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 320, 1979, s. 214-224.
- REED, D. J.: Cellular defense mechanisms against reactive metabolites. In: ANDERS, M. W. (ed.): Bioactivation of foreign compounds. Orlando, Academic Press 1985, s. 71-108.
- RIFKIND, A. B. - GANNON, M. - GROSS, S. S.: Arachidonic acid metabolism by dioxin-induced cytochrome P-450: A new hypothesis on the role of P-450 in dioxin toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 172, 1990, s. 1180-1188.
- SAFE, S. - MASON, G. - SAWYER, T. - ZACHAREWSKI, T. - HARRIS, M. - YAO, C. - KEYS, B. - FARRELL, K. - HOLCOMB, M. - DAVIS, D. - SAFE, L. - PISKORSKA-PLISZCZYNSKA, J. - LEECE, B. - DENOMME, M.A. - HUTZINGER, O. - THOMA, H. - CHITTIM, B. - MADGE, J.: Development and validation of *in vitro* induction assays for toxic halogenated aromatic mixtures: A review. *Toxicol. Ind. Hlth*, 5, 1989, s. 757-775.
- SAWYER, T. - SAFE, S.: PCB isomers and congeners: Induction of aryl hydrocarbon hydroxylase and ethoxyresorufin-O-deethylase enzyme activities in rat hepatoma cells. *Toxicol. Lett.*, 13, 1982, s. 87-94.
- SAWYER, T. - BANDIERA, S. - SAFE, S. - HUTZINGER, O. - OLIE, K.: Bioanalysis of polychlorinated dibenzofuran and dibenzo-p-dioxin mixtures in fly ash. *Chemosphere*, 12, 1983, s. 529-535.
- SINCLAIR, J. F. - WOOD, S. - LAMBRECHT, L. - GORMAN, N. - MENDE-MUELLER, L. - SMITH, L. - HUNT, J. - SINCLAIR, P.: Isolation of four forms of acetone-induced cytochrome P-450 in chicken liver by h.p.l.c. and their enzymic characterization. *Biochem. J.*, 269, 1990, s. 85-91.
- SMITH, G. S. - WATKINS, J. B. - THOMPSON, T. N. - ROZMAN, K. - KLAASEN, C. D.: Oxidative and conjugative metabolism of xenobiotics by livers of cattle, sheep, swine and rats. *J. anim. Sci.*, 58, 1984, s. 386-395.
- SOUČEK, P. - GUT, I.: Cytochromes P-450 in rats: structures, functions, properties and relevant human forms. *Xenobiotica*, 22, 1992, s. 83-103.

STEGEMAN, J. J. - LECH, J. J.: Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: Carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. *Environ. Hlth. Perspect.*, 90, 1991, s. 101-109.

TILLITT, D. E. - ANKLEY, G. T. - VERBRUGGE, D. A. - GIESY, J.P. - LUDWIG, J. P. - KUBIAK, T. J.: H4IIE rat hepatoma cell bioassay-derived 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin equivalents in colonial fish-eating waterbird eggs from Great Lakes. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 21, 1991, s.91-101.

U. S. EPA, 1989 Update to the interim procedures for estimating risks associated with exposures to mixtures of chlorinated dibenzo-p-dioxins and -dibenzofurans (CDDs and CDFs), č. 625, 1989.

Došlo 26. 7. 1993

Cytochromes P450: Toxicological significance of level determination

Drug-metabolizing enzymes, especially cytochrome P450-dependent monooxygenases, are involved in the metabolic activation of the majority of xenobiotics and in the production of oxygen radicals. The most significant are cytochromes P450IA1 and IA2, but also P450IIB, IIE and IIIA are involved. Various classes of xenobiotics induce levels of distinct P450 forms. Their key position in the expression of toxic, mutagenic, carcinogenic and other adverse effects of reactive metabolites and oxygen radicals allows us:

1. to estimate the tetrachlorodibenzo-p-dioxin-like toxicity in both environmental mixtures and individual contaminants by the measurement of induction of P450IA1;
2. to monitor the contamination of ecosystems by the measurement of P450 induction in selected species;
3. to determine toxicity potentials of drugs, agrochemicals, industrial contaminants and other xenobiotics by the measurement of P450IA, IIB, IIE, IIIA and/or IVA levels in model systems.

Kontakní adresa:

RNDr. Miroslav Machala, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno
Tel. 05 41321241, fax 05 41211229

OBSAH – CONTENTS

Halouzka R., Celer V.: Patologie a diferenciální diagnostika onemocnění Maedi-Visna – Pathology and differential diagnostics of the Maedi-Visna disease	705
---	-----

Čonková E., Para L., Kočišová A.: Inhibícia rastu niektorých mikroskopických húb vybranými organickými kyselinami – Inhibition of the moulds growth by selected organic acids.	723
---	-----

Číkoš Š., Kuchár S., Koppel J.: Telesná hmotnosť a skeletálny rast samíc potkana po ovariektómii – The body weight and skeletal growth of female rats after ovariectomy.	729
---	-----

PŘEHLEDNÝ REFERÁT

Machala M.: Cytochromy P450: Toxikologický význam stanovení jejich hladin – Cytochromes P450: Toxicological significance of level determination. . .	739
--	-----

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Česká akademie zemědělských věd a Slovenská akadémia pôdohospodárskych vied - Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Vychází měsíčně ● Redaktorka: ing. Zdenka Radošová ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/257541 ● Sazba: Studio DOMINO - ing. Jakub Čížek ● Popovice 144, 267 01 Králův Dvůr, tel.: 0311/22959 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1993

Rozšiřuje PNS a. s. Informace o předplatném podává a objednávky přijímá redakce PNS, doručovatel tisku a Administrace centralizovaného tisku, Hvozdčanská 149 00 Praha 4-Roztyly.