

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

9

VOLUME 40 (LXVIII)  
PRAHA  
SEPTEMBER 1995  
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření České akademie zemědělských věd a s podporou Ministerstva zemědělství České republiky

An international journal published by the Czech Academy of Agricultural Sciences and with the promotion of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic

## Editorial Board – Redakční rada

### Chairman – Předseda

Prof. MVDr. Karel Hruška, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Members – Členové

Prof. MVDr. Jan Bouda, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. ing. Jiří Brož, CSc., Reinfelden, Switzerland

RNDr. Mjlaň Fránek, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. Ivan Herzig, CSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumír Hoffrek, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

M. V. Nermut, MD., PhD., Prof. emeritus, National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

Prof. MUDr. Leopold Pospíšil, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

Prof. MVDr. Bohumil Ševčík, DrSc., BIOPHARM – Research Institute of Biopharmacy and Veterinary Drugs, a. s., Jílové u Prahy, Czech Republic

Prof. MVDr. Zdeněk Věžník, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

### Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

**Cíl a odborná náplň:** Časopis uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny.

Časopis Veterinární medicína uveřejňuje práce v češtině, slovenštině a angličtině.

Časopis je citován v bibliografickém časopise Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, a abstrakty z časopisu jsou zahrnuty v těchto databázích: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 40 vychází v roce 1995.

**Přijímání rukopisů:** Rukopisy ve dvou vyhotoveních je třeba zaslat na adresu redakce: Ing. Zdeňka Radošová, vedoucí redaktorka, Ústav zemědělských a potravinářských informací, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. Den doručení rukopisu do redakce je uváděn jako datum přijetí k publikaci.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a měly by být zaslány na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1995 je 396 Kč.

**Aims and scope:** The journal publishes experimental papers and reviews from all fields of veterinary medicine.

The journal Veterinární medicína publishes original scientific papers written in Czech, Slovak or English.

The journal is cited in the bibliographical journal Current Contents – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, abstracts from the journal are comprised in the databases: Agris, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicity:** The journal is published monthly (12 issues per year), Volume 40 appearing in 1995.

**Acceptance of manuscripts:** Two copies of manuscript should be addressed to: Ing. Zdeňka Radošová, editor-in-chief, Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/25 75 41–9, fax: 02/25 70 90, e-mail: braun@uzpi.agrec.cz. The day the manuscript reaches the editor for the first time is given upon publication as the date of reception.

**Subscription information:** Subscription orders can be entered only by calendar year (January–December) and should be sent to: Institute of Agricultural and Food Information, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Subscription price for 1995 is 92 USD (Europe), 96 USD (overseas).

# LIGHT AND SCANNING ELECTRON MICROSCOPY OF ENDOMETRIUM OF OVARIECTOMIZED COWS TREATED WITH OESTRADIOL

## SVĚTELNÁ A RASTROVACÍ ELEKTRONOVÁ MIKROSKOPIE ENDOMETRIA OVARIKTOMOVANÝCH KRAV PO APLIKACI ESTRADIOLU

V. Kummer, Z. Zralý, J. Čanderle, J. Mašková

*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Histomorphological and histochemical investigations showed that a single intramuscular dose of 3 mg or oral dose of 10 mg oestradiol were sufficient to induce physiological oestrogenization of endometrium in ovariectomized cows. The first signs of endometrial activation were observed already on post-treatment Day 2. The resumption of secretory activity of surface epithelium cells and epithelial cells of proximal segments of uterine glands, active hyperaemia, slight oedema of *lamina propria*, and infiltration with cells responsible for non-specific resistance of endometrium (lymphocytes, lymphoid cells, monocytes, macrophages, mast cells) were the typical signs of oestrogenic stimulation. Morphological and activation signs of the effects of oestradiol persisted up to post-treatment Day 9. High doses of oestradiol (10 mg intramuscularly or intravenously, 20 mg orally) induced non-physiological hyperoestrogenization of uterine mucosa.

cow; oestradiol; endometrium; histology; histochemistry; scanning electron microscopy; ovariectomy

**ABSTRAKT:** U sedmi ovariektomovaných krav byly sledovány účinky různých dávek a způsobů aplikace estradiolu (estradiolpropionát 3 a 10 mg *i. m.*, 10 mg *i. v.*; estradiolbenzoát 10 a 20 mg *p. o.*) na morfoloickou a funkční aktivaci endometria. Vzorky endometria byly odebrány biopsií nebo po odporažení krav v období 2. až 9. dne po aplikaci estradiolu. Prvé známky aktivity endometria při aplikaci nižších dávek estradiolu (3 mg *i. m.* a 10 mg *p. o.*) byly zjištěny již od 2. dne po ošetření. Typickým obrazem estrogenní stimulace je nárůst výšky a obnovení sekreční aktivity buněk povrchového epitelu a epitelu horních úseků děložních žlázek, aktivní hyperemie horních vrstev *stratum compactum*, lehká edematizace a v celém rozsahu *lamina propria* infiltrace buňkami, které tvoří základ nespecifické rezistence endometria. Infiltrát tvoří převážně mononukleární buňky (lymfocyty, lymfoidní buňky, monocyty), dále makrofágy a žírné buňky, výskyt polymorfonukleárních buněk je nízký. Infiltrující buňky postupně prostupují do horních vrstev endometria a mají sklon k tvorbě neztělně ohraničených lymfoidních nodulů (obr. 1 až 3). Projevy estrogenizace endometria vrcholí 4. až 5. den a účinky estradiolu přetrvávají až do 9. dne po ošetření. Dynamiku sekrece buněk povrchového epitelu názorně dokumentují snímky rastrovací elektronové mikroskopie (obr. 5, 6). Rychlou funkční responzi endometria na estradiol dokládá vysoký vzestup aktivity nespecifické esterázy a alkalické fosfatázy v povrchovém epitelu a cévním systému již od 2. dne po ošetření. V celém rozsahu endometria vykazují makrofágy vysokou aktivitu nespecifické esterázy a kyselé fosfatázy. Výsledky histomorfologického a histochemického vyšetření prokázaly, že k dosažení fyziologického stupně estrogenizace endometria je dostatečná jednorázová aplikace 3 mg *i. m.*, resp. 10 mg *p. o.* estradiolu. Aplikace vyšších dávek (10 mg *i. m.*, 10 mg *i. v.* a 20 mg *p. o.*) již vyvolává stavy hyperestrogenizace, které se projevují vakuolární degenerací buněk povrchového epitelu s narušením jeho integrity, rozsáhlejšími subepiteliálními hemoragiemi, masivní buněčnou infiltrací *lamina propria*, cystickou dilatací děložních žlázek a hyperplazií stromatu (obr. 4, 7, 8).

kráva; estradiol; endometrium; histologie; histochemie; rastrovací elektronová mikroskopie; ovariektomie

### INTRODUCTION

Oestrogens play the key role in the dynamics of cyclic morphological and activity changes of bovine uterine mucosa. Their effects on individual cell types of endometrium during the oestrous cycle have been outlined in histomorphological (Vollmerhaus,

1957; Věžník et al., 1970) and histochemical (Skjerven, 1956; Kummer, 1971) studies and completed by electron microscopic investigations (Marinov and Lovell, 1968; Kojima and Selander, 1970).

Much less attention has been paid to the effects of exogenous oestrogens in ovariectomized cows (Lar-

son et al., 1965; Věžík et al., 1973) and to the assessment of hyperoestrogenization of uterine mucosa (Věžík et al., 1979).

Oestrogens stimulate the activity of endometrial non-specific defense mechanisms (Nicol et al., 1965; Hussain, 1989), thus enhancing the uterine resistance to natural or experimental infections (Broome et al., 1960; Carson et al., 1988).

The effects of the hygienically safe natural oestrogens have motivated the efforts to use them in practical gynaecology, particularly as causal substitutes in females suffering from oestrogenic deficiencies (Kummer et al., 1991; Zralý et al., 1993 and others). In such cases, the timing and dosage are the decisive factors for successful treatment.

The aim of our experiments was to assess the effects of oestradiol on endometrium of ovariectomized cows at various dosage levels and ways of administration.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

The effects of oestradiol on uterine mucosa were investigated in seven ovariectomized, clinically normal cows – crosses of the Black Pied Lowland and Czech Pied breeds in their second to third lactation with mean liveweight of 580 kg. The cows were monitored for cyclic ovarian activity and ovariectomies were made three to five months after parturition. The first treatment with oestradiol was made at least six weeks after the ovariectomy. An interval of at least thirty days was observed in repeatedly treated cows.

### Hormones and ways of administration

Oestradiol propionate (Agofollin inj. ad us. vet., Biotika) was administered in 10 experiments (5, 3 and 2 experiments with 3 mg and 10 mg intramuscularly and 10 mg intravenously, respectively).

Oestradiol benzoate (Agofollin coated tablets, Léčiva) was administered in 8 experiments (5 and 3 experiments with 10 mg orally and 20 mg orally, respectively).

### Sampling

Bioptic samples of endometrium were collected from the middle segment of uterine horns before the treatment and on post-treatment Days (henceforth only Day/Days) 2, 3, 4, 7 and 9. The samples for scanning electron microscopy were collected from cows slaughtered on Days 2 or 3, except for two orally treated cows in which the treatment-to-slaughter interval was 9 days.

## Sample processing

The samples for histological examinations were fixed in Bouin's solution and stained with haematoxylin-eosin, or with toluidine blue to set off mast cells. The samples for histochemical examinations were fixed in chilled Baker's solution. Alkaline and acid phosphatases and non-specific esterase were visualized by the azocoupling and the indogenous methods, respectively (Lojda and Papoušek, 1967).

The samples for scanning electron microscopy were rinsed with water and fixed in 3% glutaraldehyde. The preparations were dehydrated and dried in the conventional manner, plated with gold (Polaron) and viewed with the electron microscope Tesla BS 300.

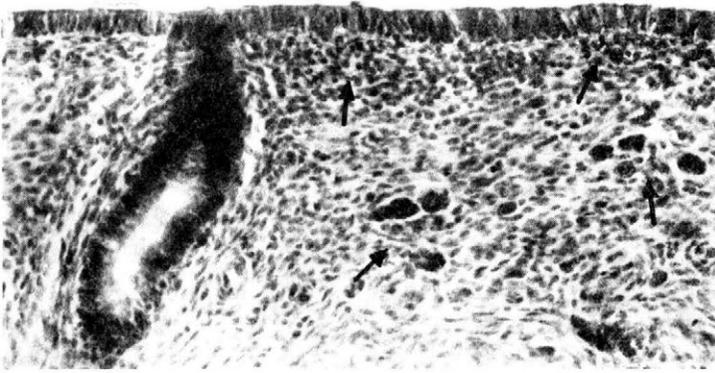
## RESULTS

The first signs of the effects of exogenous oestradiol on endometrium were demonstrable by histological examinations already on Day 2. In the cows treated with the lower doses of oestradiol (3 mg intramuscularly or 10 mg orally), the flat, quiescent monolayer surface epithelium thickened and here and there transformed into cylindrical epithelium. Dilatation of blood vessels, slight oedema and in some cases active hyperaemia in upper parts of *stratum compactum* were observed in *lamina propria*. Beginning infiltration of *stratum compactum* by mononuclear cells (lymphocytes, lymphoid cells, monocytes) was a typical finding. On the other hand, polymorphonuclear cells were rather scarce. Amplification of mast cells and activated histiocytes (macrophages) was evident in all endometrial layers.

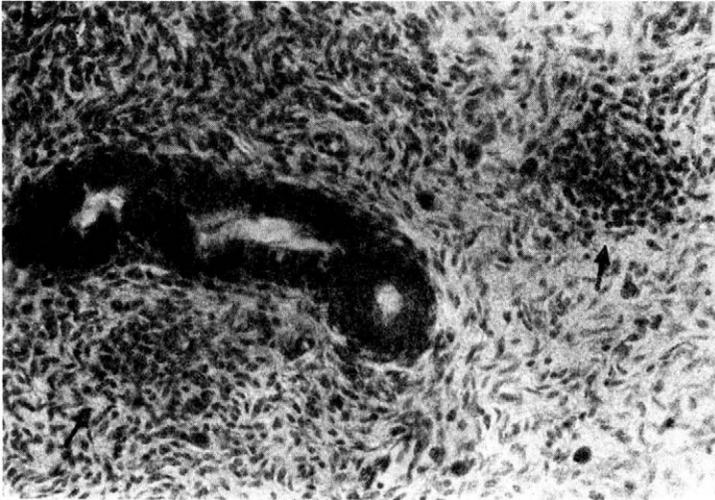
The first signs of secretory activity of surface epithelium and epithelium of proximal segments of uterine glands were observed from Day 3. Mobile cells migrated towards the upper parts of uterine mucosa and cumulated there forming bands in subepithelial layers. Mononuclear cells showed a tendency to the formation of noduli. Beginning metachromasia of cytoplasmic granules and scarcely degranulation and release of the cell contents into the adjacent tissues were seen in mast cells. At this time also hyperaemia and oedema of *lamina propria* culminated (Fig. 1–3).

Secretory activity of cells of surface epithelium, but not that of the epithelium of proximal segments of uterine glands, was evident between Days 7 and 9. Hyperaemia and oedema of endometrium disappeared slowly, but increased cellular infiltration of the upper layers of *stratum compactum* persisted. Here and there, round-nucleate cells cumulated massively in the subepithelial space and penetrated into uterine lumen. Lymphoid nodules with indistinct demarcation were seen frequently. The release of granules from mast cells was more frequent and the number of macrophages decreased.

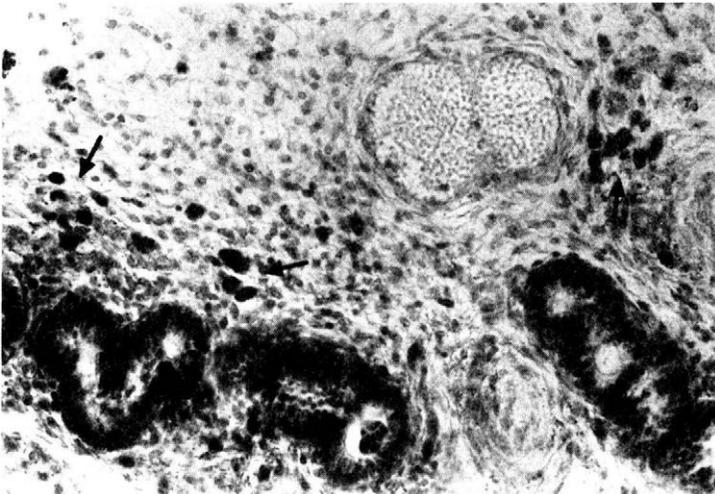
The basic histological pattern and dynamics of endometrial changes were similar in the cows receiving the oral dose of 20 mg oestradiol, but signs of



1. Subepithelial cumulation of mononuclear cells penetrating sporadically through the surface epithelium; numerous macrophages and mast cells. Endometrium of an ovariectomized cow 3 days after oral administration of 10 mg oestradiol (toluidine blue, 250x)



2. Formation of indistinctly demarcated lymphoid noduli in *stratum compactum*. Endometrium of an ovariectomized cow 3 days after oral administration of 10 mg oestradiol (toluidine blue, 250x)



3. Numerous mast cells and macrophages; oedema and hyperaemia of *stratum spongiosum*. Endometrium of an ovariectomized cow 3 days after intramuscular administration of 3 mg oestradiol (toluidine blue, 250x)

a stronger oestrogenization were evident particularly in the surface epithelium (subnuclear vacuolar degeneration, release of cells resulting in partial disintegration of the surface epithelium). The penetration of mononuclear cells through the epithelium and small subepithelial haemorrhages were more frequent.

The intramuscular and intravenous treatments of ovariectomized cows with 10 mg oestradiol induced

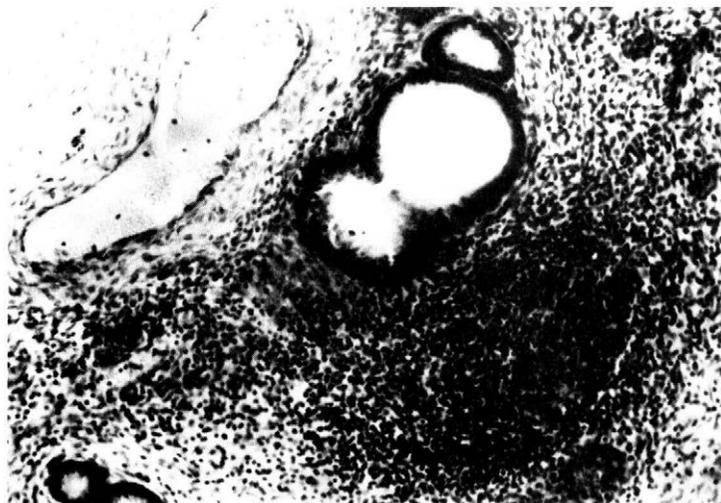
clear cells through the epithelium and small subepithelial haemorrhages were more frequent.

apparent signs of hyperoestrogenization. A high degree of vacuolar degeneration of surface epithelium cells, their release and the resulting large areas of disintegrated epithelium were seen already on Days 2 to 3. Also frequent were cystic dilatations of glandular lumina and subepithelial haemorrhages contributing to the disintegration of surface epithelium. Endometrium was massively infiltrated by lymphocytes and lymphoid cells forming here and there large accumulations (Fig. 4). Areas of hyperplasia of connective tissue were apparent in basal parts of *stratum spongiosum*.

Dynamics of changes in surface epithelium, as seen in scanning electron micrographs, confirmed the findings obtained by the conventional histological technique. Formation and accumulation of secretions in apical parts of cells as signs of activation of surface epithelium were evident 2 to 3 days after the intramuscular and oral administrations of 3 and 10 mg oestra-

diol, respectively. The activation started in smaller, irregularly demarcated areas in which the secreting cells protruded over the flat, still quiescent cells (Fig. 5). The activation was more pronounced in caruncular areas.

Advanced stages of secretory activity and numerous post-secretion cells were observed on Day 9 (Fig. 6). Oral administration of 20 mg oestradiol resulted in hyperstimulation of endometrial surface epithelium, characterized by extensive desquamations in caruncular areas (Fig. 7). Intramuscular administration of 10 mg oestradiol induced conspicuous non-physiological endometrial reactions evident from ruptures and disintegration resulting from enormous afflux, extensive epithelial desquamation, wide dilatation of orifices of uterine glands, formation of deep crypts, and penetration of erythrocytes, or even haemorrhages on the surface of uterine mucosa (Fig. 8).



4. Extensive aggregation of mononuclear cells; cystic dilatation of uterine glands; marked oedema and hyperaemia of *stratum spongiosum*. Endometrium of an ovariectomized cow 2 days after intramuscular administration of 10 mg oestradiol (toluidine blue, 160x)



5. Resumption of activity of surface epithelium; cumulation of secretions in apical parts of cells. Intercaruncular area of endometrium of an ovariectomized cow 3 days after oral administration of 10 mg oestradiol (SEM, 1500x)

The rapid response of endometrium to exogenous oestradiol was also confirmed by increased enzymatic activity. A high increase of the non-specific esterase activity was recorded in surface epithelium and proximal segments of uterine glands already on Day 2. High activity was also observed in cells of the endometrial vascular system and macrophages. An increase of alkaline phosphatase activity was evident in apical parts of surface epithelial cells, the capillary network, cells of *Stratum compactum* and basal parts of *stratum spongiosum*. On the other hand, the activity of acid phosphatase was low in all endometrial structures except for macrophages showing intensive reactions. Within the used dosage range, the enzymatic activities were apparently dose-independent. A decrease of enzymatic activities, particularly in surface and uterine gland epithelium, was observed on Days 7 to 9, but increased alkaline phosphatase activity persisted in hyperplastic areas of endometrial stroma.

## DISCUSSION

Intramuscular and oral administrations of 3 and 10 mg oestradiol, respectively, were found to be sufficient to induce in ovariectomized cows histomorphological and activity changes in endometrium corresponding to those resulting from the effects of endogenous oestrogens during a spontaneous ovarian cycle. In addition to active hyperaemia of endometrial stroma and slight oedema, the treatments induced apparent responses of surface epithelium cells and cell populations responsible for the non-specific resistance of endometrium.

Growth of the flat, quiescent cells of surface epithelium in ovariectomized cows treated with oestradiol was described earlier by Larson et al. (1965) and Věžník et al. (1973). In our experiments, the resumption of the secretory activity of surface epithelium

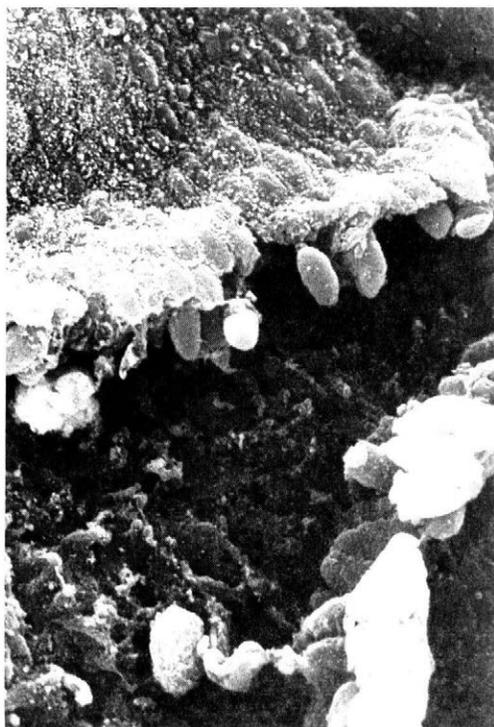
and epithelium of proximal segments of uterine glands was apparent already on Day 3. The earlier resumption of the secretory activity in caruncular areas is obviously associated with the more abundant blood supply. Věžník et al. (1973), who administered lower doses of oestradiol (0.5 or 2 mg), observed secretion in surface epithelium cells, obtained by uterine washing or microabrasion of endometrium, from post-treatment Day 7. Compared with the conventional histological technique, scanning electron microscopy of uterine epithelium yielded a more detailed picture, similarly like reported by Fathalla et al. (1975) and Bollo et al. (1990).

The rapid activation of surface epithelium was also evident from the increase of enzymatic activity already on Day 2. Larson et al. (1970) and Věžník et al. (1973) also described a cumulation of glycogen and PAS-positive material. The increase of enzymatic activity extended also to the epithelium of proximal segments of uterine glands. It is therefore evident that, at the lower dosages, oestradiol induced metabolic activation of cells in an extent and degree corresponding to those seen in the follicular and oestral stages of the ovarian cycle in intact cows (Vollmerhaus, 1957; Hacket and Hafs, 1969; Kummer et al., 1971 and others). The morphological and functional pattern of oestrogenic stimulation of epithelial endometrial cells persisted in the ovariectomized cows up to Day 9.

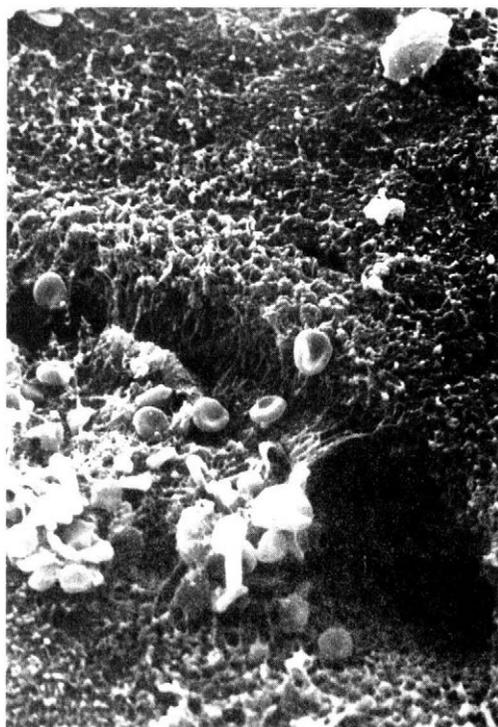
One of the typical features of the oestrogen-stimulated endometrium is the activation of mobile cells as a component of the „clearance mechanisms“ described by Grunert (1961) and Schulz (1961). The dynamics of the occurrence of the mobile cells in bovine endometrium during the ovarian cycle was described already earlier by Skjerven (1956). Polymorphonuclear and mast cells and histiocytes dominated in the cell population during the follicular and oestral stages of the ovarian cycle. Contrary to these findings,



6. Surface epithelium cells, mostly after the release of secretions. Marginal caruncular area of endometrium of an ovariectomized cow 9 days after oral administration of 10 mg oestradiol (SEM, 5000x)



7. Extensive desquamation of surface epithelium. Caruncular area of endometrium of an ovariectomized cow 9 days after oral administration of 20 mg oestradiol (SEM, 2000x)



8. Disintegration of surface epithelium and small haemorrhages resulting from enormous afflux and hyperaemia. Caruncular area of endometrium of an ovariectomized cow 2 days after intramuscular administration of 10 mg oestradiol (SEM, 2000x)

mononuclear cells (lymphocytes, lymphoid cells and monocytes), histiocytes and mast cells prevailed in the infiltrations seen in our experimental cows, while granulocytes occurred much less frequently. We can also confirm the high activity of lysosomal enzymes (acid phosphatase and non-specific esterase) in histiocytes as described by Hermanns et al. (1987).

Our findings allow us to conclude that the amount and composition of the cell infiltrate in ovariectomized, oestrogen-treated cows resembled the pattern of endometrial restoration as seen in cows with undisturbed puerperium on post-partum Days 15 to 20 (Kumner et al., 1989). The basal progesterone and elevated 17beta-oestradiol concentrations generated a similar endocrinological background. The increased number of neutrophil granulocytes in endometrium may have resulted from a higher bacterial contamination of the uterine environment.

The way of administration of the lower doses oestradiol (3 mg intramuscularly or 10 mg orally) had no marked effects on the endometrial response. Oestradiol concentrations in blood plasma of ovariectomized heifers and post-parturient cows treated with low doses (Zralý et al., 1992) did not significantly exceed the values normal for the oestrus stage and their dynamics

was not thus different to induce significantly different endometrial responses. The treatments of ovariectomized cows with the higher doses of oestradiol (10 mg intramuscularly or 20 mg orally) induced apparent signs of endometrial hyperoestrogenization.

The results presented here have completed the current knowledge of endometrial responses to the treatment with oestrogens. The effects of various dose levels and ways of administration can serve as criteria for the application of oestrogens in therapy and prevention of reproductive disorders.

#### Acknowledgement

The authors wish to thank Mr. Jiří Kudrna for his excellent technical collaboration in sample processing and making of scanning electron micrographs.

#### REFERENCES

- BOLLO, E. – BIOLATTI, B. – PAU, S. – GALLONI, M.: Scanning electron microscopy of pathologic changes on the epithelial surfaces of the uterus and uterine tubes of cows. *Amer. J. Vet. Res.*, 51, 1990: 137–142.

- BROOME, A. W. – WINTER, A. J. – McNUTT, S. H. – CASIDA, L. E.: Variations in uterine response to experimental infection due to the hormonal state of the ovaries. II. The mobilization of leukocytes and their importance in uterine bactericidal activity. *Amer. J. Vet. Res.*, 21, 1960: 675–681.
- CARSON, R. L. – WOLFE, D. F. – KLESIOUS, P. H. – KEMPPAINEN, R. J. – SCARLAN, C. M.: The effects of ovarian hormones and ACTH on uterine defense to *Corynebacterium pyogenes* in cows. *Theriogenology*, 30, 1988: 91–97.
- FATHALLA, M. A. – LIPTRAP, R. M. – GEISSINGER, H. D.: Combined scanning electron and light microscopy of biopsy samples of bovine uterus. *Can. J. Comp. Med.*, 39, 1975: 457–461.
- GRUNERT, E.: Zur sogenannten endometrialen Selbstreinigung beim Rind (Teil I). In: *Proc. IVth Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, 1961: 312–315.
- HACKETT, A. J. – HAFS, H. D.: Biochemical and morphological changes in bovine tubular genitalia during the estrous cycle. *J. Anim. Sci.*, 29, 1969: 35–38.
- HERMANN, W. – SCHMELZER-PERSICKE, I. – SCHRÖDER, A.: Enzymhistologische Untersuchungen am Endometrium des Rindes. *Tierärztl. Umsch.*, 10, 1987: 806–813.
- HUSSAIN, A. M.: Bovine uterine defense mechanisms: A review. *J. Vet. Med. B*, 36, 1989: 641–651.
- KOJIMA, Y. – SELANDER, U.: Fine structure of bovine surface endometrial cells in the estrous and luteal phases. *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 104, 1970: 557–571.
- KUMMER, V.: Histochemie endometria skotu. [Disertační práce.] VÚVeL, Brno 1971. 135 pp.
- KUMMER, V. – ZRALÝ, Z. – ČANDERLE, J.: Histologie endometria krav v průběhu fyziologického a patologického puerperia. *Veter. Med. (Praha)*, 34, 1989: 603–612.
- KUMMER, V. – ZRALÝ, Z. – ČANDERLE, J.: Použití přípravku Agofollin inj. ad usum vet. (Biotika) k prevenci a terapii poruch puerperia krav. *Biopharm*, 27, 1991: 249–256.
- LARSON, L. L. – MARION, G. B. – GIER, H. T.: Cyclic changes in the bovine endometrium. *J. Anim. Sci.*, 24, 1965: 923.
- LARSON, L. L. – MARION, G. B. – GIER, H. T.: Glycogen metabolism in bovine endometrium. *Amer. J. Vet. Res.*, 31, 1970: 1929–1935.
- LOJDA, Z. – PAPOUŠEK, F.: Histochemie enzymů. I. vyd. Brno, 1967. 110 pp.
- MARINOV, U. – LOVELL, J. E.: Cytology of the bovine uterine epithelium during the estrous cycle. *Amer. J. Vet. Res.*, 29, 1968: 13–30.
- NICOL, T. – VERNON-ROBERTS, B. – QUANTOCK, D. C.: The influence of various hormones on the reticulo-endothelial system: endocrine control of body defence. *J. Endocrinol.*, 33, 1965: 365–383.
- SCHULZ, L. C.: Zur sogenannten endometrialen Selbstreinigung beim Rind (Teil II). In: *Proc. IVth Int. Congr. Anim. Reprod.*, Hague, 1961: 316–323.
- SKJERVEN, O.: Endometrial biopsy studies in reproductively normal cattle – clinical, histochemical and histological observations during cycle. *Acta Endocrin*, 22, 1956, Suppl. 26: 1–101.
- VĚŽNÍK, Z. – HRUŠKA, K. – KUMMER, V. – VRTĚL, M.: Význam laváže a mikroabrace endometria v diagnostice poruch plodnosti. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1970. 94 pp.
- VĚŽNÍK, Z. – KUMMER, V. – ŠVIHÁLKOVÁ, A. – HRUŠKA, K. – SCHLEGLOVÁ, J.: Stanovení ukazatelů insuficience endometria. [Výzkumná zpráva.] Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1973. 40 pp.
- VĚŽNÍK, Z. – HRUŠKA, K. – KUMMER, V.: Endometriumsreaktionen unter dem Einfluss von Biotechnika. *Mh. Veter.-Med.*, 34, 1979: 924–929.
- VOLLMERHAUS, B.: Untersuchungen über die normalen zyklischen Veränderungen der Uterusschleimhaut des Rindes. *Zbl. Veter. Med., R. A*, 4, 1957: 18–50.
- ZRALÝ, Z. – KUMMER, V. – ČANDERLE, J. – RASZYK, J. – ŠIŠÁK, M.: Vliv estrogenů na fagocytární aktivitu krevních leukocytů jalovic a krav. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 1992: 65–74.
- ZRALÝ, Z. – KUMMER, V. – ČANDERLE, J. – MAŠKOVÁ, J. – ŠIŠÁK, M.: Využití perorální aplikace estradiolbenzoátu při terapii a prevenci poruch puerperia krav. *Veterinářství*, 43, 1993: 214–217.

Arrived on 29th May 1995

---

Contact Address:

MVDr. Vladimír K u m m e r, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika, Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 32 12 29

---

# ENVIRONMENTAL HEALTH PERSPECTIVES

Journal of the National Institute of Environmental Health Sciences,  
Research Triangle Park, N.C., U.S.A.

Měsíčník pro uveřejňování výsledků výzkumu, diskusi, rozšiřování nových informací a myšlenek je novým pravidelným přírůstkem knihovny Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně. U.S. Department of Health and Human Services, které je vydavatelem časopisu, tak vyjádřilo uznání výsledků dosažených v tomto ústavu. Zařazení ústavu do adresáře pracovišť, kterým je časopis bezplatně poskytován, doporučil člen redakční rady MUDr. Radim Š r á m , DrSc., koordinátor mezinárodního výzkumného programu Teplice, na kterém se úspěšně podílí tým Dr. J. R u b e š e . Díky jeho vynikajícím výsledkům tak ústav získal důležitý zdroj informací.

Časopis uveřejňuje vědecká sdělení (Research Articles and Research Advances), která podrobuje náročnému lektorskému řízení a autorům poskytuje 200 separátních výtisků jejich článku. Dále uveřejňuje názory, myšlenky a perspektivy (Editorial Statements, Reviews and Commentaries, Correspondence and Meeting Reports), nové informace o životním prostředí (Environews) a monografie (Supplements, Symposia and Conference Proceedings). Z dalších informací jsou zajímavé National Institute of Environmental Health Science News, New Books, Announcements of Conferences, Fellowships, Grants & Awards, Position Announcements aj.

Environmental Health Perspectives je uváděn v Current Contents a v roce 1993 měl impact faktor 1,481.

V 6. čísle 103. svazku, které má 96 stran, vychází mj.:

Effects of Coumestrol on Estrogen Receptor Function and Uterine Growth in Ovariectomized Rats  
Fertility in Mice after Prenatal Exposure to Benzopyrene and Inorganic Lead  
Xenoestrogens Released from Lacquer Coatings in Food Cans

Zájemci o pravidelné zaslání obsahu tohoto časopisu nebo o zaslání kopie uveřejněných článků, se mohou obrátit na knihovnu Výzkumného ústavu veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno (tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: kahr.@vuvcl.anet.cz).

*Karel Hruška*

# MUTAGENICITY OF STABLE DUST AND DRINKING WATER ON SWINE AND CATTLE FARMS\*

## MUTAGENNÍ AKTIVITA STÁJOVÉHO PRACHU A NAPÁJECÍ VODY V CHOVECH PRASAT A SKOTU

J. Raszyk<sup>1</sup>, Z. Pokorná<sup>2</sup>, V. Strnadová<sup>1</sup>, V. Gajdušková<sup>1</sup>, R. Ulrich<sup>1</sup>, A. Jarošová<sup>1</sup>, J. Salava<sup>3</sup>, J. Palác<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

<sup>2</sup>Regional Hygienic Laboratory, Brno, Czech Republic

<sup>3</sup>District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic

**ABSTRACT:** Single pilot examinations of mutagenicity of stable dust and drinking water were made on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.) in the district of Hodonín in summer 1994. The mutagenicity was examined by the Ames test using the indicator strains *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 with (+S9) or without (-S9) metabolic activation. At the same time the contents of selected pesticides (PES) and polychlorinated biphenyls (PCB) in stable dust and drinking water and that of polycyclic aromatic hydrocarbons in stable dust were determined. Increased mutagenicity was demonstrated in drinking water (strain TA 98 with metabolic activation; index Rt/Rk 3.6–7.7) and stable dust (strain TA 100 with metabolic activation; index Rt/Rk 2.2) collected on the swine farm M. High contents of PAH (8.246 mg/kg) and PCB (0.263 mg/kg) were also found in the dust samples collected on this farm. Only drinking water showed mutagenic activity (strain TA 98 without metabolic activation; index Rt/Rk 2.6) on the swine farm D. On both the farms, the number of revertants was dose-dependent. Increased content of PAH (2.553 mg/kg) was also demonstrated on the dust samples collected on the farm D. No significant increase (twofold or higher when compared with negative controls) of mutagenic activity of stable dust or drinking water was demonstrable on the swine farm T. and the cattle farm N. Substances responsible for the mutagenicity of drinking water on the farms D. and M. have not yet been identified. Anyway, the increase of mutagenicity of stable dust and drinking water should be taken as a warning that mutagens that can jeopardise animal and human health have penetrated into the stable environment.

mutagenicity; Ames test; stable dust; drinking water; polycyclic aromatic hydrocarbons; polychlorinated biphenyls; pesticides; swine; cattle; health risks

**ABSTRACT:** Ve třech chovech prasat (D., M., T.) a v jednom chovu skotu (N.) na okrese Hodonín bylo v letním období roku 1994 provedeno orientační, jednorázové vyšetření mutagenní aktivity stájového prachu a napájecí vody. Mutagenní aktivita byla posuzována Amesovým testem s využitím indikátorových kmenů *Salmonella typhimurium* TA 98 a TA 100 s metabolickou aktivací (+S9) a bez ní (-S9). V odebraných vzorcích stájového prachu a napájecí vody byly současně stanoveny vybrané pesticidy (PES) a polychlorované bifenyls (PCB). Polycyklické aromatické uhlovodíky (PAH) byly stanoveny pouze ve stájovém prachu. V chovu prasat M. byla zjištěna zvýšená mutagenní aktivita napájecí vody (na kmeni TA 98 s metabolickou aktivací; index Rt/Rk 3,6 – 7,7) a stájového prachu (na kmeni TA 100 s metabolickou aktivací, index Rt/Rk 2,2). Současně byla zaznamenána závislost počtu revertant na dávce. V chovu prasat M. byly ve stájovém prachu nalezeny nejvyšší koncentrace PAH (8,246 mg/kg) a PCB (0,263 mg/kg). V chovu prasat D. byla zjištěna pouze mutagenní aktivita napájecí vody (na kmeni TA 98 bez metabolické aktivace; index Rt/Rk 2,6), která se současně projevila závislostí počtu revertant na dávce. Rovněž v chovu prasat D. byla zjištěna ve stájovém prachu zvýšená koncentrace PAH (2,553 mg/kg). V chovu prasat T. a v chovu skotu N. nebyla zjištěna zvýšená mutagenní aktivita (ve smyslu dvojnásobného a vícenásobného vzestupu počtu indukovaných revertant vzhledem k negativní kontrole) stájového prachu a napájecí vody. Doposud nevíme, které látky (mutageny) jsou zodpovědné za zvýšenou mutagenní aktivitu napájecí vody v chovech prasat D. a M. Zjištění zvýšené mutagenní aktivity stájového prachu či napájecí vody pro nás představuje varovný signál, že do stájového prostředí pronikly mutageny, které mohou ohrožovat zdraví zvířat i jejich ošetřovatelů.

mutagenní aktivita; Amesův test; stájový prach; napájecí voda; polycyklické aromatické uhlovodíky; polychlorované bifenyls; pesticidy; prasata; skot; zdravotní riziko

\* The work was financially supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project No. A 093 95 0048) and the Ministry of Environment of the Czech Republic (Project GA/1650/93).

## INTRODUCTION

Numerous xenobiotics, such as heavy metals, pesticides, herbicides, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH), polychlorinated biphenyls (PCB), mycotoxins, etc., some of which are known as mutagens (R a s z y k et al., 1994), can penetrate into premises of animal husbandry.

The pollutants may be present in feeds, drinking water or paint coats, can be introduced into the environment of farm animals as drugs (e.g. lindane), disinfectants, disinsectants or rodenticides, or produced by fungi (mycotoxins). Other sources of pollutants are agricultural machines and mechanisms contaminating the environment with exhaust gases, fuel, lubricants, brake or hydraulic fluids, etc.

A suitable indicator of environmental pollution is the sedimented stable dust (R a s z y k et al., 1986, 1989). Xenobiotics that have penetrated into stables are usually demonstrable in the dust.

The presence of mutagens in premises for farm animals can be demonstrated by cytogenetic tests (R u b e š et al., 1988, 1992).

Direct evidence of the presence of mutagens in the environment can be obtained by Ames test (M a r o n and A m e s, 1983). The test is suitable for the demonstration of the general genotoxic effect, but not for the identification of mutagens which are responsible for it. A preliminary estimation can be made on the basis of results obtained with various indicator strains. Thus, reversions in the strains TA 98 and TA 100 are indicative of the presence of substances or mixtures thereof inducing frameshift and substitution mutations, respectively.

Mutagenicity of drinking water in the Czech Republic has been systematically monitored by Č e r n á (1986, 1993), Č e r n á et al. (1987, 1994).

No systematic investigations of the mutagenicity of individual components of the environment of farm animals have been conducted in the Czech Republic so far.

The aim of our investigations was to obtain pilot data on mutagenicity of stable dust and drinking water on four farms in the district of Hodonín.

## MATERIAL AND METHODS

### FARMS

1. The pig fattening farm D housed 17,000 animals in 15 halls. The halls had windows in aluminium mantles. Ventilation was controlled by temperature sensors. Dry feed was fed in 13 halls and a liquid diet (system Schauer) in the remaining 2 halls. Drinking water came from a public source and the pigs were watered from small troughs or valve or bowl drinkers.
2. The swine farm M. housed 20,500 animals, of which 10,000 were fattened pigs. The construction and

- ventilation of the halls were the same as described for the farm D. Fattened pigs were fed a liquid diet (system Schauer) which completely covered the requirement for water. Water used for the preparation of the liquid feed came from the farm's own source.
3. The swine farm T. housed 2,000 animals, out of which 1,600 were fattened pigs. The masonry fattening houses with windows were ventilated with an exhaust system. Although the fattened pigs were fed a liquid diet, they had access to valve-type drinkers. Drinking water came from a public source.
  4. The farm N. housed 340 dairy cows, 30 calves (up to 20 days old) and 108 breeding heifers. The animals were housed in loose barns with metal sheet mantles and only dams in the farrowing house were tied. The houses were ventilated with a pressure system. The dairy cows were fed roughage and concentrates according to milk production and watered from drinking bowls. Drinking water came from a public source.

### SAMPLING

Stable dust samples were collected with a vacuum cleaner, or, from places with a difficult access, with a short-handled brush and shovel. The collected dust was screened through a 0.7 mm mash. The larger particles were discarded and the smaller ones, making approx. 85% of the total amount, were used for analyses. On the swine farms, the samples were collected in fattening houses 10 to 14 days before the end of the fattening period. On the cattle farm, the dust sample was collected in the farrowing house.

The samples of drinking water were collected from outlets other than the drinkers, because it was impossible to connect the sampling sets to the watering system. The sampling was made by the standard method (A H E M, 1989) using a metal sampling set with a separable column filled with a sorbent (Separon). The pollutants were separated by passing a 200-L volume through the column connected to a water outlet. The sampling was continuous lasting 8 to 24 hours depending on the actual water pressure.

### MUTAGENICITY TESTS

Ames test (M a r o n and A m e s, 1983) was used for the demonstration of mutagenicity of the stable dust and drinking water. The samples were extracted with organic solvents and evaporated and the residue was dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO). Water samples were prepared by separating the mostly organic particles in a column of Separon (TESSEK, Prague) with particle size of 0.125 to 0.200 µm and extraction with acetone (A H E M, 1989). The Ames test uses a set of strains of *Salmonella typhimurium* with various types of mutation in the histidine operon causing the

failure to propagate in histidine-free media. The induced mutation results in the resumption of histidine production by the strain associated with a loss of dependency on endogenous histidine. The *Salmonella typhimurium* strains TA 98 (frameshift mutations) and TA 100 (substitutions) were used for the demonstration of mutagenicity. The strains (Cat. Nos. CCM 3811 and 3812, respectively) were obtained from the Czech Collection of Microorganisms at the Faculty of Sciences, Masaryk University, Brno, Czech Republic. The samples were classified as positive in the number of revertants increased to at least a twofold when compared with negative controls and was dose-dependent at the same time. A twofold or higher increase of the number of induced revertants is regarded as a sign of significant genotoxic activity.

## CHEMICAL ANALYSES

Chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls (PCB) and polycyclic aromatic hydrocarbons were chosen as the typical hazardous contaminants to be determined in samples of stable dust. The analyses of drinking water were limited to chlorinated pesticides and PCB.

Chlorinated pesticides and PCB were determined with the capillary gas chromatograph Varian VISTA with  $^{63}\text{Ni}$  electron capture detector (Gajdůšková and Ulrich, 1992) and the analytes were evaluated with the chromatographic set SCW 1.0 (Apex). The pollutants were extracted from the samples with organic solvents (acetone or petroleum aether), co-extracted substances were separated by absorption chromatography in a column of Florisil and the pollutants were detected by capillary gas chromatography with an electron capture detector. The content of PCB was expressed as a sum in terms of Delor 103, and Delor 106, representing the lower-chlorinated and the higher-chlorinated PCB, respectively. The sum of DDT includes o,p'-DDE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDD, and p,p'-DDD.

Polycyclic aromatic hydrocarbons were determined only in dust samples. Prior to analysis, the samples were dried at 50 °C. Two grams of the dry sample were extracted with dichloromethane in the apparatus SOX-TEC. Elemental sulfur in the extract was reduced by the addition of active copper during one hour of shaking. The condensed extract was purified by adsorption chromatography in a column of silicagel. Residues of PAH were eluted with dichloromethane and PAH were separated by capillary gas chromatography (Varian 3400) and detected by mass spectrometry (Finnigan MAT, Model Tracker). The sum of PAH included phenanthrene, anthracene, fluoranthene, pyrene, benzo(a)anthracene, chrysene, benzo(a)pyrene, and dibenzo(a,h)anthracene. The method for the determination of PAH was modified and tested within the project A 093 95 0132 of the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (team headed by Ing. Věra Gajdůšková, CSc.).

Conventional methods were used for statistical processing of the results. Mutagenic activity was evaluated by the standard procedure of Ames test (AHEM, 1989).

## RESULTS

### Mutagenicity tests on the swine farm D.

Only a weak but dose-dependent mutagenic effect of water on the strain TA 98 without metabolic activation was demonstrable (index Rt/Rk 2.6).

Stable dust did not induce mutations in any of the two test strains (TA 98 and TA 100).

### Mutagenicity tests on the swine farm M.

Drinking water induced a significant and dose-dependent increase of the number of revertants in the strain TA 98 with metabolic activation (index Rt/Rk 3.6 to 7.7), indicating a significant genotoxic activity of the drinking water.

Approx. twofold and dose-dependent increases in the number of revertants were induced by stable dust only in the strain TA 100 without metabolic activation (index Rt/Rk 1.9) or with metabolic activation (index Rt/Rk 2.2). The twofold and higher increases in the numbers of induced revertants are evidence of significant genotoxic effects of the examined stable dust.

### Mutagenicity tests on the swine farm T.

Neither drinking water nor stable dust induced mutagenic effects in any of the test strains (TA 98 and TA 100).

### Mutagenicity tests on the cattle farm N.

Drinking water did not induce mutations in any of the test strains (TA 98 and TA 100). No Rt/Rk values were calculated for stable dust, because the sample was contaminated by bacteria and no correct reading of the number of revertant colonies was possible.

### Contents of selected pesticides and PCB in drinking water

The results are shown in Tab. I. The concentrations permissible in the Czech Republic (Czech Standard ČSN 75 7111 Drinking Water) were not exceeded in any of the samples of drinking water. Among the herds under study, the highest concentrations of DDT (10.3 ng/l) and PCB (40.9 ng/l) were found on the swine farm T. and the highest concentration of gamma HCH (48.0 ng/l) in the cattle farm N.

## Contents of selected pesticides, PCB and PAH in stable dust

The results of analyses are shown in Tab. II. Among the farms under study, the highest concentrations of PAH (8.25 mg/kg) and PCB (0.26 mg.kg<sup>-1</sup>) were found on the swine farm M. and increased concentrations of PAH (2.55 mg/kg) also on the swine farm D. The highest concentration of gamma HCH (0.139 mg/kg) was found on the cattle farm N.

## DISCUSSION

Ames test detects primarily organic non-polar or weakly polar lipophilic compounds including the majority of mutagens (Černá, 1986, 1993), such as pesticides (DDT), polychlorinated biphenyls, polycyclic aromatic hydrocarbons, etc. The test yields general information on mutagenicity without identifying the organic contaminants responsible for the effect.

Several dozens of substances with demonstrated mutagenic activity have been detected as contaminants of drinking water. It is probable, however, that many significant mutagens contaminating drinking water have not yet been identified (Černá, 1993). In recent years, considerable attention has been paid to mutagenic substances resulting from the effects of chlorination of drinking water on organic substances, such as trihalomethanes, haloacetonitriles and chlorinated hydroxyfuranones (Gilli et al., 1991; Černá, 1993; Koivusalo et al., 1994). Chlorinated hydroxyfuranones may be responsible for a considerable part of the mutagenic activity of drinking water. Much attention has been paid particularly to the compound MX, which is [3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone]. MX was demonstrated in water in Finland, the United States, Great Britain and Japan (Koivusalo et al., 1994) in concentrations varying between 0 and 33 ng/l (Kinac et al., 1992) and its presence has been linked with tumours of the urinary and digestive organs.

The mutagenic activity of drinking water may also result from the presence of phenylalanine, which is one of its natural components. Mutagenic effects on the indicator strains TA 98 and TA 100 were demonstrated in phenylalanine-containing water after UV irradiation (Moriske et al., 1993) and 22 chlorinated organic compounds, including chloroform, 3-chlorotoluene, benzaldehyde, etc. were identified in phenylalanine-containing water after chlorination (Lahaniatis et al., 1994).

The occurrence in drinking water for farm animals of organic pollutants has not been systematically investigated in the Czech Republic. Five samples of drinking water were tested for the presence of chlorinated pesticides and PCB in 1993 (Valcl et al., 1994). Mutagenicity was tested in samples of drinking water for human consumption collected in the districts of Teplice and Prachatic within the international project „The Teplice Programme“. Significant mutagenicity, i.e. a twofold or higher increase of the number of revertant colonies of the strain TA 98 (without metabolic activation) was demonstrated in 64.42 and 15.00% of the samples collected in the districts of Teplice and Prachatic, respectively (Černá et al., 1994).

Effects of stable dust on the health of farm animals have been investigated in the author's laboratory since 1982. Dust samples collected on farms contained a number of organic and inorganic pollutants, such as mercury, cadmium, lead, arsenic, chromium, chlorinated pesticides, herbicides, aflatoxin B<sub>1</sub> and the non-antibiotic growth promotor Nitrovin (Raszkyk et al., 1986, 1989). Attention is also paid to the presence in stable dust of bacterial endotoxin (Dutkiewicz et al., 1994). Adverse effects of stable dust on the health of farm animals (Robertson, 1989) and the personnel (Larson et al., 1994) were demonstrated. No studies of mutagenicity of stable dust have been made in the Czech Republic so far.

Out of the four farms under study, the highest environmental mutagenic activity was found on the swine

I. Contents of selected pesticides and polychlorinated biphenyls (ng/l) in drinking water collected on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.)

Farm	HCB	α, β HCH	γ HCH	sum DDT	sum PCBs
D.	1.130	0.830	4.500	3.430	31.740
M.	0.640	0.320	1.990	1.600	25.900
T.	0.400	1.100	6.600	10.300	40.900
N.	1.800	1.300	48.000	3.400	15.600

II. Contents of selected pesticides, polychlorinated biphenyls and polycyclic aromatic hydrocarbons (mg/kg) in the stable dust collected on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.)

Farm	HCB	α, β HCH	γ HCH	sum DDT	sum PCBs	sum PAHs
D.	0.001	0.001	0.033	0.013	0.040	2.553
M.	0.001	0.002	0.022	0.023	0.263	8.246
T.	0.016	0.008	0.011	0.007	0.019	0.135
N.	0.005	0.003	0.139	0.034	0.078	0.095

farm M. The activity of drinking water was demonstrated using the test strain TA 98 with metabolic activation (Rt/Rk 3.6 to 7.7) and that of stable dust using the strain TA 100 with metabolic activation (Rt/Rk 2.2). Also on this farm, the highest concentrations of PAH (8.25 mg/kg) and PCB (0.26 mg/kg) were found in stable dust. No significant differences in the contents of chlorinated pesticides and PCB in drinking water were found between the four farms. Increased concentrations of DDT and PCB and of gamma HCH were demonstrated only on the swine farm T. and the cattle farm N., respectively. The farm M. used a private well for watering of pigs and the water was not treated by chlorination. Therefore, mutagens resulting from such treatment should be ruled out. The substances responsible for the mutagenicity of drinking water on the farm M. have not yet been identified.

Mutagenicity was also demonstrated in drinking water on the swine farm D. using the test strain TA 98 without metabolic activation (Rt/Rk 2.6). Also on this farm, the source of the mutagenic activity has remained unknown. The farm is supplied with water from a public source and the water is treated by chlorination. Hence, mutagenicity induced by this treatment cannot be ruled out. A high concentration of PAH (2.55 mg/kg) was found in the stable dust collected on the farm D. Therefore, their presence in the drinking water will be investigated in the ongoing monitoring.

No mutagenicity was demonstrable in drinking water or stable dust collected on the remaining two farms T. and N.

Seasonal factors should be considered when evaluating the mutagenicity of water. Usually, higher mutagenicity is recorded in spring and during the subsequent months; this is probably due to intensive agricultural activity associated with rinsing and seepage of pesticides through the soil (Černá et al., 1993). Our investigations were made in summer – a fact that should be taken into consideration in the interpretation of our results.

Similar seasonal variations were also reported for the contents of extractable substances in drinking water. The lowest values are found in winter. Attention should therefore be paid to the possible relationship between the contents of the extractable substances in and mutagenic activity of drinking water (Černá et al., 1994).

Water is a complex mixture of substances with variable composition and concentrations of natural and anthropogenic pollutants. In such a mixture, additive, synergetic and antagonistic effects between the components and formation of new chemical structures resulting from the interactions can be presumed. The overall genotoxic effect is then a result of mutual reactions of the components (Černá, 1993).

The demonstration of mutagenic activity of individual components of the environment of farm animals should be taken as a warning that animal and human health can be endangered by mutagens. Therefore, the

pilot investigations should be followed by systematic chemical analyses of drinking water and stable dust with the aim to identify substances or groups thereof which are responsible for the demonstrated mutagenicity. It should be borne in mind, however, that not all the significant mutagens, penetrating into the environment of farm animals, have been identified.

#### Acknowledgement

The authors wish to thank Mrs. Jitka Dufková of the Regional Hygienic Laboratory, Brno, for her competent technical assistance.

#### REFERENCES

- AHEM: Metody genotoxického monitorování genotoxických účinků faktorů prostředí – standardní metodika. IX. Amesova metodika. Příloha 20, 1989: 33–56.
- ČERNÁ, M.: Chemické kontaminanty ve vodě a jejich možné pozdní účinky. Českoslov. Hyg., 31, 1986: 485–491.
- ČERNÁ, M.: Mutagenita pitné vody. Českoslov. Hyg., 38, 1993: 356–361.
- ČERNÁ, M. – HÁJEK, V. – STEJSKALOVÁ, E. – DOBIÁŠ, L. – ZUDOVÁ, Z.: Chemické kontaminanty ve vodě a jejich možné pozdní účinky. II. Praktické zkušenosti s vyšetřováním mutagenní aktivity pitné vody. Českoslov. Hyg., 32, 1987: 355–361.
- ČERNÁ, M. – PASTORKOVÁ, A. – HÁJEK, V. – RÖSSNER, P. – NOŽČKA, J. – BENEŠ, I.: Mutagenita pitné vody v okrese Teplice a Prachatic. Hygiene, 39, 1994: 48–55.
- DUTKIEWICZ, J. – POMORSKI, Z. J. H. – SITKOWSKA, J. – KRYSINSKA – TRACZYK, E. et al.: Airborne microorganisms and endotoxin in animal houses. Grana, 33, 1994: 85–90.
- GAJDŮŠKOVÁ, V. – ULRICH, R.: Využití analýzy specifických kongenerů polychlorovaných bifenylů pro kontrolu potravin a surovin živočišného původu. Veter. Med. (Prah), 37, 1992: 471–478.
- GILLI, G. – CARRARO, E. – ANICICH, E. – FEA, E.: Mutagenicity in the various treatment phases of water for human consumption. Toxicol. Envir. Chem., 31–32, 1991: 335–345.
- KINAE, N. – SUGIYAMA, C. – GOTO, K. – TAKUMOTO, K. – FUROGORI, M.: Mutagenic activities of drinking water and amount of MX. Mutat. Res., 272, 1992: 268.
- KOIVUSALO, M. – JAAKKOLA, J. K. – VARTIAINEN, T. – HAKULINEN, T. – KARJALAINEN, S. et al.: Drinking water mutagenicity and gastrointestinal and urinary tract cancers: an ecological study in Finland. Amer. J. Publ. Hlth, 84, 1994: 1223–1228.
- LAHANIAS, E. S. – BERGHEIM, W. – KOTZIAS, D. – PILIDIS, G.: Formation of chlorinated hydrocarbons by water chlorination. Chemosphere, 28, 1994: 229–235.
- LARSSON, K. A. – EKLUND, A. G. – HANSSON, L. O. – ISAKSSON, B. N. – MALMBERG, P. O.: Swine dust causes intense airways inflammation in healthy subjects. Amer. J. Resp. Crit. Care Med., 150, 1994: 973–977.

- MARON, D. M. - AMES, B. N.: Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat. Res.*, 113, 1983: 173-215.
- MORISKE, H. J. - WIESE, M. - RÜDEN, H.: Mutagenic activity of organic contents and of drinking water samples before and after UV irradiation using the Ames bioassay. *Mutat. Res.*, 291, 1993: 257-258.
- RASZYK, J. - GAJDŮŠKOVÁ, V. - MAŠEK, J. - DOČEKALOVÁ, H. - BARTOŠ, J. - NEUMANNOVÁ, M.: Obsahy chemických prvků, pesticidů, polychlorovaných bifenyliů, aflatoxinu B<sub>1</sub> v krmných směsích, napájecí vodě a stájovém sedimentovaném prachu ve velkochovech prasat. *Českoslov. Hyg.*, 34, 1989: 201-206.
- RASZYK, J. - GAJDŮŠKOVÁ, V. - RUBEŠ, J. - URBANOVÁ, J. - NEZVEDA, K. et al.: Ekotoxikologická studie okresu Hodonín zaměřená na ochranu zdraví hospodářských zvířat a potravního řetězce pro člověka (Zpráva pro Ministerstvo životního prostředí České republiky o řešení projektu GA/1650/93 v roce 1994). Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství 1994. 28 p.
- RASZYK, J. - KNOTEK, Z. - GAJDŮŠKOVÁ, V. - MAŠEK, J. - DOČEKALOVÁ, H. et al.: Fyzikální, chemické a biologické vyšetření prachu z velkovýkrmn prasat. *Veter. Med. (Praha)*, 31, 1986: 233-244.
- ROBERTSON, J.: *Farm Dust and Health*. 1. ed. Aberdeen, Centre for Rural Building 1989. 28 p.
- RUBEŠ, J. - BORKOVEC, L. - HOŘÍNOVÁ, Z. - URBANOVÁ, J. - PROROKOVÁ, I. - KULÍKOVÁ, L.: Cytogenetic monitoring of farm animals under conditions of environmental pollution. *Mutat. Res.*, 283, 1992: 199-210.
- RUBEŠ, J. - RASZYK, J. - HOŘÍNOVÁ, Z. - GAJDŮŠKOVÁ, V. - MAŠEK, J. et al.: Monitorování chromozomálních mutací prasat ve velkochovech. *Veter. Med. (Praha)*, 33, 1988: 143-150.
- VALCL, O. (ed.): *Kontaminace potravních řetězců cizorodými látkami - situace v České republice v roce 1993*. *Inform. Bull. SVS ČR*, 1/1994. 325 p.

Arrived on 11th April 1995

---

*Contact Address:*

MVDr. Josef R a s z y k , CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika, Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29

---

# EMBRYOTOXIC EFFECTS OF THE COMBINATION OF ZEARELENONE AND VOMITOXIN (4-DEOXYNIVALENOL) ON CHICK EMBRYO

## EMBRYOTOXICKÝ ÚČINEK KOMBINACE ZEARELENONU A VOMITOXINU (4-DEOXYNIVALENOLU) NA KUŘECÍ ZÁRODEK

D. Veselý, D. Veselá

*Institute of Experimental Medicine, Academy of Sciences of the Czech Republic, Prague, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Mycotoxins zearalenone and vomitoxin (4-deoxynivalenol) are often joint contaminants of grains infested by micromycetes of the genus *Fusarium*. Toxic effects of both mycotoxins on experimental organisms and farm animals are well known, but we have not found any literary reference to toxic effects of the combination zearalenone and vomitoxin. Embryotoxic effects of zearalenone, vomitoxin and combinations of various doses of zearalenone with constant addition of vomitoxin were studied in a three-day chick embryo. The objective of the study was to determine the coaction of vomitoxin on zearalenone embryotoxicity. Thermostat-incubated fertile eggs of White Leghorn hens were candled after three-day incubation, the shell above the embryo was removed, and within the embryotoxicity range zearalenone, vomitoxin and various doses of zearalenone with constant addition of 2 µg vomitoxin were applied to morphologically normal embryos. The groups of ten embryos were applied mycotoxins and their combinations in 10 µl of their solutions to amnions using a special glass micropipette. Control group comprised twenty embryos which were applied 10 µl of solvents used, 1% NaHCO<sub>3</sub> and 10% ethanol. The eggs were covered with glass plates and their incubation was going on until the eighth day of their development. The embryos that died during incubation were discarded. On the eighth day of development, surviving embryos were taken out from the eggs and malformations of head, orofacial region, body wall, limbs and heart were determined microscopically. Tab. I shows total numbers of dead and malformed embryos after application of the particular doses of zearalenone, vomitoxin, their combinations and control solvents. The embryotoxicity range started at a dose of 5 to 20 µg per embryo. Zearalenone did not have any teratogenic effects on chick embryos. Applications of high doses of zearalenone (100 and 30 µg) instantly caused arrhythmia, atrio-ventricular dissociation or even heart stoppage. The beginning of the embryotoxicity range for vomitoxin was found to be within the narrow range of 1 to 3 µg per embryo. Among malformations, only a defect of the interventricular septum of the heart was found in 4% of the cases. The combined embryotoxic effects of zearalenone and vomitoxin were of additive, and mostly embryo-lethal nature. Among the malformations searched for, only 5% of the embryos exhibited a defect of the interventricular septum of the heart. Due to the good prediction fitness of chick embryo that has been proved by estimates of mycotoxin toxicity to mammals it is possible to suppose that toxic effects of the frequently occurring combinations of zearalenone and vomitoxin in fusarium-infected feeds will also be of additive nature for farm animals.

embryotoxicity; chick embryo; zearalenone; vomitoxin (4-deoxynivalenol); joint effect

**ABSTRAKT:** Třídenním kuřecím zárodkům byly v rozmezí pásma embryotoxicity podány intraamniálně fuzáriové mykotoxiny zearalenon, vomitoxin a různé dávky zearalenonu s konstantním přídatkem 2 µg vomitoxinu na zárodek. Zárodky se dále inkubovaly a uhynulé vyřazovaly. V osmém dni vývoje se přežívající zárodky vyjmuly z vajec a pod mikroskopem odečteny malformace hlavy, orofaciální oblasti, tělní stěny, končetin a srdce. Počátek pásma embryotoxicity zearalenonu byl nalezen v rozmezí 5 až 30 µg na zárodek. Zearalenon neměl na kuřecí zárodky teratogenní účinky. Počátek pásma embryotoxicity vomitoxinu byl v úzkém pásmu 1 až 3 µg na zárodek. Z malformací se vyskytoval u přežívajících zárodků po podání vomitoxinu ve 4 % pouze defekt mezikomorové srdeční přepážky. Kombinovaný účinek zearalenonu s vomitoxinem byl aditivní a 5 % zárodků mělo defekt mezikomorové srdeční přepážky. Z predikční schopnosti kuřecího zárodku při stanovení toxicity mykotoxinů na savce lze předpokládat, že toxický účinek často se vyskytující kombinace zearalenonu a vomitoxinu v zaplísňených krmivech bude aditivní také pro hospodářská zvířata.

embryotoxicita; kuřecí zárodek; zearalenon; vomitoxin (4-deoxynivalenol); společný účinek

Mykotoxiny zearalenon a vomitoxin jsou častými kontaminanty obilovin napadených mikromycetami rodu *Fusarium*. Jeden z nejběžnějších zástupců těchto mikromycet, *F. graminearum*, může syntetizovat oba mykotoxiny (Veselá aj., 1981; Veselá a Veselý, 1983; Gilbert, 1989; Müller a Schwadorf, 1993). Zearalenon je možné stručně charakterizovat jako sloučeninu s velmi nízkou toxicitou pro savec ale s významnými estrogenními účinky. Zearalenon způsobuje svými estrogenními účinky ztrátu v chovech hospodářských zvířat. Při vyšších dávkách zearalenonu v krmivech dochází u intoxikovaných zvířat ke snížení fertility a resorpcí plodu. Teratogenní účinek zearalenonu na savčí zárodky nebyl zjištěn. U plodů pokusných zvířat kterým byl podáván extrakt z kultur fuzárií o známém obsahu zearalenonu nebo přirozeně kontaminovaná krmiva se někdy projevily poruchy osifikace. Mírné teratogenní účinky těchto extraktů fuzárií produkujících zearalenon se přičítaly přítomnosti dalších mykotoxinů syntetizovaných fuzárií (Long a Diekman, 1984; Kuiper-Goodman aj., 1987; Smith aj., 1990). Vomitoxin má dráždivé účinky na pokožku a trávicí ústrojí zvířat, spojené se zvracením a odmítáním kontaminovaného krmiva. Při delším podávání způsobuje poruchy krvetvorby a imunosupresi. Podobné radiomimetické účinky mají i některé další trichotheceny, ke kterým se vomitoxin svou strukturou řadí. Vomitoxin snižuje užitek chovů tím, že zvířata odmítají kontaminovaná krmiva. Teratogenní efekt vomitoxinu na embryonální vývoj saveců nebyl pozorován. Po vysokých dávkách se projevují u pokusných zvířat poruchy gestace spojené s akutním toxickým účinkem vomitoxinu na organismus matky (Khera aj., 1984; Friend aj., 1983; Morrissey a Vesonder, 1985).

Embryotoxicitou zearalenonu a vomitoxinu na kuřecím zárodku jsme se zabývali v práci Veselý a Veselá (1991). Teratogenní účinky obou mykotoxinů na kuřecí zárodky uvedeného stáří jsme nepozorovali. Protože společný výskyt zearalenonu a vomitoxinu na cereálních napadených fuzárií je častý, otestovali jsme embryotoxické účinky různých dávek zearalenonu s konstantním přídatkem vomitoxinu na třídenním kuřecím zárodku. Cílem práce bylo zjistit spolupůsobení vomitoxinu na embryotoxicitu zearalenonu.

## MATERIÁL A METODY

Zearalenon jsme izolovali z kultury *F. culmorum*, kultivované na pšenici (Veselá aj., 1981), vomitoxin z izolátu *F. graminearum* kultivovaného na sterilní rýži (Veselá a Veselý, 1983). Základní roztok zearalenonu o koncentraci 100 µg/10 µl jsme připravili rozpouštěním 100 mg zearalenonu v 10 ml sterilního roztoku 1% NaHCO<sub>3</sub>. Základní roztok vomitoxinu o koncentraci 10 µg/10 µl rozpouštěním 10 mg vomitoxinu v 1 ml ethanolu a doplněním redestilovanou vodou na objem

10 ml. Roztoky mykotoxinů nižších koncentrací jsme získali ředěním základních roztoků redestilovanou vodou. Ke studiu společného účinku obou mykotoxinů jsme připravili roztoky o koncentracích 0,3 až 30 µg/10 µl zearalenonu s konstantním přídatkem 2 µg vomitoxinu/10 µl.

Skupinám deseti morfologicky normálních třídenních kuřecích zárodků bílých leghornek z farmy Dobřenice jsme aplikovali intraamniálně 10 µl roztoků mykotoxinů o zvolené koncentraci. Kontrolní skupiny tvořilo 20 zárodků, kterým jsme aplikovali 10 µl 1% NaHCO<sub>3</sub> nebo 10% ethanol. Po aplikaci jsme vejce dále inkubovali, uhynulé zárodky průběžně vyřazovali a osmý den vývoje jsme přežívající zárodky vyjmuli z vajec. Pod mikroskopem jsme odečetli malformace hlavy, orofaciální oblasti, tělní stěny, končetin a srdce. Technické provedení je podrobněji popsáno v práci Veselý aj., (1992).

## VÝSLEDKY A DISKUSE

Součty uhynulých a malformovaných zárodků po aplikaci jednotlivých dávek zearalenonu, vomitoxinu a jejich kombinací jsou uvedeny v tab. I. Bezprostředně po podání vysokých dávek zearalenonu (100 a 30 µg) kuřecím zárodkům docházelo k arytmií, síňkomorové disociaci až k zástávám srdce. Poměrně úzké rozmezí počátku pásma embryotoxicity 5 až 30 µg odpovídá vlastnostem slabě cytotoxické látky s malým teratogenním potenciálem. U přežívajících zárodků jsme při vyhodnocení nenalezli žádné ze sledovaných malformací. Zearalenon neměl na třídenní kuřecí zárodky teratogenní účinky.

Při vyhodnocování malformací vyvolaných aplikací vomitoxinu kuřecím zárodkům jsme našli malý podíl zárodků s defektem mezikomorové přepážky srdce (4 %). Počátek pásma embryotoxicity vomitoxinu leží v úzkém rozmezí 1 až 3 µg. Ani vomitoxin nemá na kuřecí zárodky významný teratogenní efekt a silně převažuje jeho účinek embryoletální.

Společný účinek různých dávek zearalenonu s konstantním přídatkem 2 mg vomitoxinu znázorněn v tab. I je aditivní. Také spektrum malformací v porovnání s jednotlivými mykotoxiny zůstalo stejné. U 5 % přežívajících zárodků v pásmu počátku embryotoxicity jsme pozorovali defekty mezikomorové přepážky srdce.

O spolupůsobení vomitoxinu a zearalenonu na embryonální vývoj jsme nenalezli přímý literární odkaz. Friend aj. (1983) studovali vliv vomitoxinu na fetální vývoj prasat. Součástí diety byla pšenice přirozeně kontaminovaná vomitoxinem a malým množstvím zearalenonu. V krmné dietě byl obsah zearalenonu deseti až třicetinásobně nižší než vomitoxinu. Proto se zearalenon vzhledem ke své nízké toxicitě v pokuse ani neprojevil. Rotter aj. (1991) studovali účinek podání vomitoxinu se dvěma mykotoxiny trichothecenového typu na mortalitu kuřecích zárodků. Toxický účinek těchto kombinací byl aditivní. Arora aj. (1983) naopak zjistili inhibiční efekt zearalenonu na teratogenitu ochratoxinu A u pokusných myší.

Dávka (µg/zárodek) <sup>1</sup>	Počet uhynulých a malformovaných zárodků <sup>2</sup> (%)		
	zearalenon	zearalenon + 2 µg vomitoxinu	vomitoxin
100	100	–	–
30	90	100	–
20	80	100	–
15	80	100	–
10	60	90	100
7	10	70	100
5	10	50	100
3	0	40	90
2	0	50	40
1	–	40	10
0,5	–	40	0
0,3	–	40	0
10 µl			
1 % NaHCO <sub>3</sub>	5		
10 % ethanol	0		

<sup>1</sup>dose (µg/embryo), <sup>2</sup>number of dead and malformed embryos

O biologických účincích mykotoxinů významných z hlediska toxicity a výskytu existuje rozsáhlá literatura. Mechanismus spolupůsobení dvou nebo více mykotoxinů, který může být inhibiční, aditivní nebo synergický nelze předem odhadnout. Ačkoliv se kombinace mykotoxinů v přirozeně zaplísňených substrátech mohou běžně vyskytovat, společné toxické účinky mykotoxinů nejsou zatím dostatečně popsány. Protože kuřecí zárodek prokázal dobré predikační schopnosti při stanovení toxicity mykotoxinů na savčí organismus, předpokládáme že toxický účinek kombinace zearalenonu a vomitoxinu na hospodářská zvířata bude aditivní.

## LITERATURA

- ARORA, R. G. – FRÖLÉN, H. – FELLNER-FELDEGG, H.: Inhibition of ochratoxin A teratogenesis by zearalenone and diethylstilboestrol. *Fd Chem. Toxicol.*, 21, 1983: 779–783.
- FRIEND, D. W. – TRENHOLM, H. L. – FISER, P. S. – THOMPSON, B. K. – HARTIN, K. E.: Effect on dam performance and fetal development of deoxynivalenol (vomitoxin) contaminated wheat in the diet of pregnant gilts. *Can. J. Anim. Sci.*, 63, 1983: 689–698.
- GILBERT, J.: Current views on the occurrence and significance of Fusarium toxins. *J. Appl. Bact. Symposium Suppl.*, 1989: 89S–98S.
- KHERA, K. S. – ARNOLD, D. L. – WHALEN, C. – ANGERS, G. – SCOTT, P. M.: Vomitoxin (4-deoxynivalenol): Effects on reproduction of mice and rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 74, 1984: 345–356.
- KUIPER-GOODMAN, T. – SCOTT, P. M. – WATANABE, H.: Risk assessment of the mycotoxin zearalenone. *Regul. Toxicol. Pharmacol.*, 7, 1987: 253–306.
- LONG, G. G. – DIEKMAN, M. A.: Effect of purified zearalenone on early gestation in gilts. *J. Anim. Sci.*, 59, 1984: 1662–1670.
- MORRISSEY, R. E. – VESONDER, R. F.: Effect of deoxynivalenol (vomitoxin) on fertility, pregnancy, and postnatal development of Sprague-Dawley rats. *Appl. Envir. Microbiol.*, 49, 1985: 1062–1066.
- MÜLLER, H. M. – SCHWADORF, K.: Natural occurrence of Fusarium toxins in barley grown in a southwestern area of Germany. *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 51, 1993: 532–537.
- ROTTER, B. A. – THOMPSON, B. K. – PRELUSKY, D. B. – TRENHOLM, H. L.: Evaluation of potential interactions involving trichothecene mycotoxins using the chick embryotoxicity bioassay. *Arch. Envir. Contam. Toxicol.*, 21, 1991: 621–624.
- SMITH, J. F. – DI MENNA, M. E. – MC GOWAN, L. T.: Reproductive performance of Coopworth ewes following oral doses of zearalenone before and after mating. *J. Reprod. Fertil.*, 89, 1990: 99–106.
- VESELÁ, D. – VESELÝ, D. – ADÁMKOVÁ, A.: Výskyt zearalenonu a fusarií produkujících zearalenon v krmivech. *Veter. Med. (Praha)*, 26, 1981: 737–741.
- VESELÁ, D. – VESELÝ, D.: Toxinogenní fuzaria izolovaná z pšenice produkující vomitoxin. *Veter. Med. (Praha)*, 28, 1983: 687–692.
- VESELÝ, D. – VESELÁ, D.: Využití kuřecího zárodku k predikci některých embryotoxických účinků mykotoxinů na savcích. *Veter. Med. (Praha)*, 36, 1991: 175–181.
- VESELÝ, D. – VESELÁ, D. – JELÍNEK, R.: Embryotoxicity of T-2 toxin and secalonic acid in embryonic chicks varies with the site of administration. *Teratology*, 46, 1992: 131–136.

Došlo 4. 1. 1995

Kontaktní adresa:

Ing. Drahomír Veselý, Ústav experimentální medicíny AV ČR, 517 83 Olešnice v Orlických horách 14, Česká republika



ÚZPI

## ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

(Slezská 7, 120 56 Praha 2, fax: 25 70 90)

vydává v roce 1995 v edici **STUDIJNÍ INFORMACE** tyto publikace:

### Řada **ROSTLINNÁ VÝROBA**

Ekonomika pěstování hlavních plodin podle ekologických zásad (*Komberec S.*)  
Synantropní zavječi – významní škůdci v zemědělství a potravinářství (*Šifner F.*)  
Vliv agrotechniky na obsah dusičnanů v zelenině (*Prugar J. – Hadačová V.*)  
Nové poznatky o pěstování sadbových brambor (*Břečka J. – Vokál B.*)  
Formulace pesticidů – přehled a trendy (*Okrouhlá M.*)

### Řada **ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA**

Kulhavost skotu (*Schneiderová P.*)  
Chov pštrosů jako nové odvětví drůbežnictví (*Snížek J.*)  
Krmivářské suroviny (*Splítek M.*)  
Výkrm skotu do nižší hmotnosti (*Krása A.*)  
Problematika odchovu telat (*Motyčka J.*)

### Řada **ZEMĚDĚLSKÁ TECHNIKA A STAVBY**

Optimální stájové a chovné prostředí pro skot (*Doležal O.*)  
Hodnocení staveb z hlediska OŽP v EU a v České republice (*Konopásek V.*)  
Technologie přípravy paliva z biomasy (*Sladký V. a kol.*)

# ANATOMICAL POSSIBILITIES OF ACCESS TO AND BLOCKADE OF *N. FEMORALIS* IN THE DOG

## MOŽNOSTI PŘÍSTUPU A NÁSLEDNÁ BLOKÁDA *N. FEMORALIS* U PSA

D. Mihelić, M. Zobundžija, A. Brkić, V. Gjurčević-Kantura, A. Slavica, G. Bačić,  
Z. Matolek, S. Brozović

*Department of Anatomy, Histology and Embryology, Veterinary Faculty, University  
of Zagreb, Republic of Croatia*

*Clinic of Surgery, Orthopedy and Ophthalmology, Veterinary Faculty, University  
of Zagreb, Republic of Croatia*

*Clinic of Oral Pathology, Dentist Faculty, University of Zagreb, Republic of Croatia*

**ABSTRACT:** The anesthesia (blockade) of canine *n. femoralis* may be performed either from lumbar or inguinal region. The insensibility of skin in the medial part of the thigh, tibia and tarsus as well as the akinesia of *m. quadriceps femoris* are attained by the anesthesia. The blockade of *n. femoralis* from the lumbar region often attains *n. obturatorius* as well. If the blockade of *n. femoralis* and *n. ischiadicus* was performed at the same time, almost all muscles of the hind limb (except *m. pectineus*, *m. gracilis*, *m. obturatoris internus* and *m. adductor*) would be inactivated, which may considerably facilitate minor surgical and postoperative interventions on the canine hind leg. Acces to femoral nerve from lumbar can be recommended because of better results and easier performance and after the application of anesthetic the effect is faster and more efficient. The signs of the obturator nerve blockade were obtain in some dogs especially in dogs with long legs.

dog; anesthesia; *n. femoralis*

**ABSTRAKT:** Anestezii (blokádu) *n. femoralis* u psa lze provést buď v oblasti lumbální nebo inguinální. Anestezii docílíme necitlivost kůže v mediální části stehna, holeně a chodidla jakož i akineze *m. quadriceps femoris*. Blokáda *n. femoralis* provedená v oblasti lumbální často také zasáhne *n. obturatorius*. Kdybychom zároveň prováděli blokádu *n. femoralis* a *n. ischiadicus*, došlo by ke znehybnění téměř všech svalů zadní končetiny (s výjimkou svalů *m. pectineus*, *m. gracilis*, *m. obturatoris internus* a *m. adductor*), což může do značné míry usnadňovat provádění menších chirurgických a pooperačních zákroků na zadní končetině psa. Můžeme doporučit přístup ke stehennímu nervu v lumbální oblasti, protože tento způsob nabízí lepší výsledky a snazší provedení zákroku. Po podání anestetika je jeho účinek rychlejší a vyšší. U některých psů, zejména u velkých plemen, jsme pozorovali příznaky blokády nervu *n. obturatorius*.

pes; anestézie; *n. femoralis*

### INTRODUCTION

Canine *n. femoralis* is formed by junction of ventral branches of the 4th, 5th and 6th lumbar nerve 1–10 and others. However, Miller et al. (1964) described the formation of *n. femoralis* by junction of ventral branches of the 4th and 5th lumbar nerve, although it may include the weak branch of the 3rd lumbar nerve. Havelka (1975) quotes that *n. femoralis* was formed by ventral branches of the 3rd–5th and the 3rd–6th lumbar nerve, although the ventral branch of the 4th lumbar nerve does not always participate in its formation. Betty (1975) described the formation of the same nerve from ventral branches of the 4th lumbar nerve, while the branches of the 3rd and of the 5th nerve were not always present. According to the branches participating

in the formation of *n. femoralis*, Fletcher (1970) classified such formations as: prefixed (3rd, 4th and 5th lumbar nerve), medially fixed (4th, 5th and 6th lumbar nerve) and postfixed (5th, 6th and 7th lumbar nerve). These formations appear in the proportion 1 : 3 : 1.

Canine *n. femoralis*, formed in a height of the plane proximal to the junction place of the 6th and 7th lumbar vertebra bodies, is orientated caudally and laterally through *m. iliopsoas*, so that both the muscle and the nerve come out from the ventral cavity into the lacuna musculorum. Then the nerve comes out from the muscle forming *n. saphenus* and splits in two terminal branches for *m. sartorius* and *m. quadriceps femoris*.

The possibility of access and blockade of equine, bovine and porcine *n. ischiadicus* in its initial part was described by Zobundžija and Babić (1985),

Brkić et al. (1991a, b, 1992, 1993), Brkić and Mihelić (1992). The access to canine, bovine and equine *n. femoralis*, namely in view of resections in its terminal part where the nerve enters in the spatium femorale, was described by few authors: Worthman (1957), Vaughan (1964), Marolt et al. (1982) and Constantinescu (1991). No data concerning the access to *n. femoralis*, in view of its blockade, could be found in the available literature. That was the main reason motivating our investigations of the possibilities to approach this nerve from the lumbar and the inguinal region.

## MATERIAL AND METHODS

Before the practical performance, and considering the possible orientational points, the position of canine *n. femoralis* and its anatomic connections were studied on a compound canine skeleton as well as on dead dogs in view to reach this nerve. Then the 10% methylene blue was applied to the conjectured location of the nerve on 5 dead dogs. On 5 dogs the origin and location of femoral nerve was reached by the dissection and osseous protuberances of exactly site of access to the femoral nerve. The some orientational points of access to the femoral nerve were tested on the compound canine skeleton, too. The location of the nerve and the place to which the methylene blue had to be applied were determined by sections so that, finally, the way of access to the nerve could be precised from lumbar and inguinal regions. After all, an experimental blockade of *n. femoralis* was practised on 12 dogs during 8 weeks by application of 5 ml of 2% xylocain 3 times a week. All together 288 tests were made. After the application of 5 ml of 2% xylocain, either from lumbar or from inguinal region, the appearance and the duration of anesthesia was controlled as well as the possibility of using the anesthetized limb for standing and movement.

## RESULTS AND DISCUSSION

The access to *n. femoralis* is possible from the regio inguinalis (ventral access) and from the regio lumbalis (dorsal access). In ventral acces to *n. femoralis*, orientational points were such as: *m. pectineus* (that can be well palpated from the medial side of the thigh), *m. iliopsoas* (in which the terminal part can be palpated by the femoral duct), and the femoral duct itself (which is located cranially from *m. pectineus* and caudally from the ending of *m. iliopsoas*; Fig. 1). The easiest way to find these points is when the dog lies on its back and if its hind legs are maximally extended, the knee joint gently flexioned, with a slight abduction of the hind leg. Following such a procedure, the access to the regio inguinalis and to the femoral duct is completely free. The position of *m. pectineus* and the beginning of

the femoral duct being determined by means of palpation, the beginning of the femoral duct should be covered by a finger in the place where it can touch the ventral wall, and then the needle should enter cranio-laterally along the lateral side of the finger tip about 1 cm deep reaching the nerve in the place where it comes out from *m. iliopsoas*.

The first blockade symptoms may be noted 6–8 minutes after the application of 5 ml of 2% xylocain at the indicated place. At first a slight knee abduction (Fig. 2) is observed and then it progresses, manifesting a combined limping emphasized as the animal supports and shortens the backward-pace walking with an absolute insecurity. As to the length of the limb, there are some differences concerning dog's reactions to the blockade of *n. femoralis*. Therefore the dogs were classified as short-legged, medium-legged and long-legged. The blockade of *n. femoralis* from the regio inguinalis was followed by the most rapid reaction in short-legged dogs. Such reaction appeared as soon as 6 minutes after the application of anesthetics. In these dogs the knee abduction was more manifest, with a very short phase in which the dogs did not strain the anesthetized leg (Fig. 3), and in 15 minutes they were able to lift the anesthetized leg by means of the crupper musculature



1. Orientational points of acces to the femoral nerve from the inguinal area. 1 – needle-position of *m. pectineus*, 2 – needle-position of *canalis femoralis*, 3 – needle-position of femoral nerve



2. Blockade of *n. femoralis* sinister. Abduction of the knee articulate

so that they could walk on three legs (Fig. 4). The canine breeds with medium-long legs reacted slower to the application of anesthetics, and the lifting of the leg was observed rather late. Long-legged dogs dragged their limbs as they paced, although sometimes the passive bringing of a leg was not evident, the limping being emphasized while walking ahead. While sitting the dogs strained their unanesthetized leg, rather turning inside out the knee joint and tucking the distal parts of the anesthetized limb under their body. After standing up the animals were not able to use the anesthetized limb. By means of palpation it was stated that, even 35 minutes later, *m. quadriceps femoris* still conserved some tonus, the skin being unresponsive in the medial part of the thigh in its proximal and distal half, which was stated by slightly pricking the skin with a needle. Blockade symptoms of *n. femoralis* were slowly disappearing and, 130 minutes after the application of anesthetics, the animals could walk with no signs of limping.

In dorsal access to *n. femoralis*, i. e. from the flank region, orientational points were such as: processus spinosus of the 7th lumbar and of the 1st sacral vertebra (that can be well palpated in dorsal median plane), cranial edge of the crista iliaca, and processus transversus



3. Unsteadiness in the moving and impossibility of loading leg after blockade of *n. femoralis*



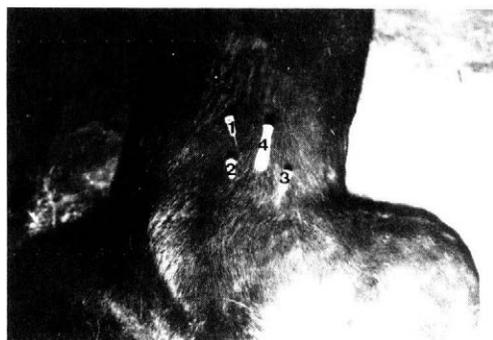
4. Impossibility of loading and lifting left leg after *n. femoralis* blockade

of the 7th lumbar vertebra (Fig. 5). In this way of application the dog has to lie on its opposite flank. The processus spinosus of the 7th lumbar and of the 1st sacral vertebra as well as the crista iliaca may be palpated. An 8 cm long needle penetrates cranio-latero-ventrally a finger wide medially from the crista iliaca through the skin, *m. longissimus lumborum* and *m. iliocostalis lumborum*, reaching the processus transversus of the 7th lumbar vertebra; then, along its caudal edge through the ligamentum iliolumbale, from the dorsal side, it enters into *m. iliopsoas* a little bit more cranially from the place where *n. femoralis* is coming out; and there the anesthetics should be applied.

After the application of anesthetics as described (i. e. 5–8 cm deep, which depends on the tallness and obesity of the animal), the first blockade symptoms of *n. femoralis* may be noted 2–3 minutes later as the dog shows some troubles while pacing and straining the knee joint. In 6–8 minutes some considerable troubles in pacing and straining on the anesthetized limb appear as the animal turns inside out the knee joint and the upper leg; finally, the animal almost drags the leg which is rather abducted and so as if it were „escaping“ outward (Fig. 6). Such symptoms are particularly manifest in long-legged dogs (Fig. 6), other symptoms being the same as in the case of ventral access. In short-legged dogs straining and pacing troubles appear rather late, after 6–8 minutes, the blockade symptoms of *n. femoralis* being less manifest. Although some pacing troubles and straining on the leg in which the nerve blockade was performed are equally evident in short-legged canine breeds, it seems that such breeds are able to compensate this handicap. The abduction of knee joint is well manifest although the limb is less abducted and it does not „escape“ so laterally as in long-legged dogs. In this access, like in the previous one, the symptoms gradually disappear so that, 130 minutes after the application of 5 ml of 2% xylocain, the animals are able to walk with no signs of limping.

When *n. femoralis* was reached from the flank region at the level of the 6th and 7th lumbar vertebra, about 5 cm deep, 5 minutes after the application of anesthetics some troubles in pacing and in straining of the treated leg appeared indicating certain weakness of the knee joint, and soon they were manifesting a combined limping emphasized while walking ahead. A total impossibility of using the limb for standing and movement appeared some 8 minutes after the application of anesthetics, and very so on the animal was not able to use neither the limb on the opposite side of the body. The symptoms were such as if the blockade were doubly applied to both *n. femoralis* (Fig. 7). About 10 minutes after the application of anesthetics, the animal was unable to control its hind legs, its tail muscles being without tonus and the anus was opened as in the case of epidural anesthesia.

When *n. femoralis* was reached from the inguinal region, dogs reacted slower to anesthetics. Short-legged dogs could compensate their limping by lifting



5. Orientational points of access to the femoral nerve from the lumbar area. 1 – needle-processus spinosus of 7th lumbar vertebra, 2 – needle-processus spinosus 1st sacral vertebra, 3 – needle-cranial margin of crista iliaca, 4 – needle-access to the femoral nerve



6. Blockade of *n. femoralis* sinister from lumbar region. Impediment in stepping forward and loading leg with very outstanding abduction



7. Impossibility of using back legs after too medial and superficial approach to the *n. femoralis* sinister

the limb by means of its thigh and crupper muscles, so they walked on three legs. Medium-legged canine breeds present rather late the blockade symptoms of *n. femoralis*, at the same time as they lift their leg. Long-legged canine breeds often drag the limb emphasizing their limping while walking ahead, because for a while their

thigh and crupper muscles are not probably strong enough to lift and sustain a big mass of their leg in this position. This can be explained by the length of their legs and, consequently, by an elevated gravity centre. In short-legged canine breeds the gravity centre is near the ground, so that for them it is more easy to compensate a temporary loss of one of their supports. On the contrary, in long-legged canine breeds the gravity centre being higher, therefore their walk is not sure, so that the swerving of the rear part of their body is more pronounced (Čermák et al., 1972 and Getty, 1975).

The tonus of *m. quadriceps femoris* was perceptible even 35 minutes after the application of anesthetics. We suppose that it is due to the construction and the position of this muscle, because *m. quadriceps femoris* pertains to a group of statodynamic muscles that, owing to the inserted connective tissue, never lose completely their tonus (Klímov, 1947).

In the access to *n. femoralis* from the flank region, the insensibility of skin and the limping that are due to anesthetics appear earlier and more intensively in long-legged than in short-legged dogs. Namely, the access from the inguinal region cannot count with any fixed orientational point on the basis of which one might know for sure whether *n. femoralis* is actually reached. So, if the anesthetic is applied rather far from the nerve, the anesthetic needs more time to reach *n. femoralis* through *m. iliopsoas* in which it is enveloped.

A stronger abduction, i. e. the turning inside out of the knee joint and of a hind leg, after the application of anesthetics through the lumbar region, especially in long-legged canine breeds, is probably due to the fact that *n. obturatorius* might be partly reached as well. *N. obturatorius* is formed by ventral branches of the same lumbar nerves as *n. femoralis*, being dominant the ventral branch of the 6th lumbar nerve. We think that some fibres from the cranial part of plexus (4th and 5th lumbar nerves) which participate in the forming of *n. obturatorius* may be affected by anesthetics, namely because in long-legged canine breeds ventral roots are more oblique and they are orientated ventro-caudally, while in short-legged breeds they are vertical so that *n. femoralis* is formed more cranially within *m. iliopsoas*. Such a conclusion is indicated by some symptoms observed in a bitch of Labrador breed that, after the application of anesthetics, presented signs of blockade of her *n. femoralis* and *n. obturatorius*. After the euthanasia, the dissection showed that *n. obturatorius* was formed by the ventral roots of the 4th, 5th and 6th lumbar nerve more cranially and more ventrally than in other dissected dogs.

We observed that, in lumbar access, out of function actually remain all muscles enervated by *n. obturatorius* as well as the regions enervated by *n. saphenus*, i. e. a superficial branch of the femoral nerve setting apart distally from the place in which *n. femoralis* can be reached.

During the effect of the anesthetic, the symptoms were very similar to those described after the resection

of bovine, equine and canine *n. femoralis* and *n. saphenus* (Worthman, 1957; Voughan, 1964; Marolt et al., 1982). The symptoms partly concord with the descriptions of the authors that have performed the blockade of *n. saphenus* (Westhues and Fritsch, 1960; Magda, 1960; De Lahunta and Habel, 1986).

In one case, in which we were not able to determine exactly the orientational points, the access to *n. femoralis* from the lumbar region presented the symptoms that were alike to those that may appear when an epidural anesthesia is applied; however, *n. femoralis* was approached more cranially and more medially and, what is even more important, the reach within *m. iliopsoas* was too shallow. According to our opinion the access from lumbar area is simpler and more secure because of the osseous orientational points and faster beginning of anesthesia than from the inguinal area. Access from inguinal area is more difficult since all the orientational points are made of soft tissue and become of that the needle could go to the wrong direction and miss the nerve.

## REFERENCES

- BRKIĆ, A. – ZOBUNDŽIJA, M. – BABIĆ, K. – MIHELIĆ, D.: Clinical significance of topographo-anatomical relations of *nervus ischiadicus* and *foramen ischiadicum majus* in horses. *Vet. Arhiv*, 61, 1991a: 233–238.
- BRKIĆ, A. – MIHELIĆ, D. – BABIĆ, K. – ZOBUNDŽIJA, M. – VESNA GJURČEVIĆ-KANTURA: Possibility of the *n. ischiadicus* blockade in *foramen ischiadicum majus* in horses. *Vet. Arhiv*, 61, 1991b: 289–295.
- BRKIĆ, A. – MIHELIĆ, D.: Usporedba efikasnostirija blokade *n. ischiadicus* u konja na *foramen ischiadicum majus* i na *incisura ischiadica minor*. Spominski sastanak prof. dr. Frana I. Zavrnik, 1992: 14–15.
- BRKIĆ, A. – ZOBUNDŽIJA, M. – BABIĆ, K. – MIHELIĆ, D. – GJURČEVIĆ-KANTURA, V.: Kliničko značenje topografsko-anatomskih odnosa *n. ischiadicus* na *foramen ischiadicum majus* u goveda. *Vet. Arhiv*, 62, 1992: 34–41.
- BRKIĆ, A. – MIHELIĆ, D. – ZOBUNDŽIJA, M. – BABIĆ, K. – GJURČEVIĆ-KANTURA, V.: Possibility of access to porcine *n. ischiadicus*. In: 16th Alps-Adria meeting of anatomists, 1993: 25.
- CONSTANTINESCU, G. M.: *Clinical Dissection Guide for Large Animals*. St. Louis, Baltimore, Boston, Chicago, London, Philadelphia, Sydney, Toronto. Mosby Year Book, 1991: 169–220.
- ČERMAK, K. – BEGO, U. – ZOBUNDŽIJA, M.: Prilog poznavanju funkcije glutealnih mišića u psa. *Vet. Arhiv*, 1972: 276–284.
- DE LAHUNTA, A. – HABEL, R. E.: *Applied Veterinary Anatomy*. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, Hong Kong, W. B. Saunders Company 1986: 141–169.
- FLETCHER, T. F.: Lumbosacral plexus and pelvic limb myotomes of the dog. *J.A.V.M.A.*, 131, 1970: 174–178.
- GETTY, R.: *Sisson-Grossman's Anatomy of the Domestic Animals*. Philadelphia, London, Toronto, W. B. Saunders Company, Vol. 2, 1975: 1705–1711.
- HAVELKA, F.: *Plexus lumbo-sacralis* u psa. *Biol. Spisy, Vys. Šk. Vet. (Brno)*, 1928: 1–48.
- KLIMOV, A. F.: *Anatomija domaćih životinja*. Zagreb, Nakladni Zavod Hrvatske, 1947: 230–236.
- MAGDA, I. I.: *Lokalanesthesie Anleitung für Tierärzte*. VEB Gustav Fischer Verlag, Jena, 1960: 153–160.
- MAROLT, J. – BEGO, U. – ZOBUNDŽIJA, M. – BRKIĆ, A.: Die Dysfunktion der *N. femoralis* und *tibialis* in Licht Klinisch-anatomischer Experimente. *Dtsch. Tierarzt. Wschr.*, 89, 1982: 189–192.
- MILLER, M. E. – CHRISTENSEN, G. C. – EVANS, H. E.: *Anatomy of the Dog*. Philadelphia, London, W. B. Saunders Company 1964: 525–610.
- VOUGHAN, L. C.: *Pheripheral nerve injuries: An experimental study in cattle*. *Vet. Rec.*, 76, 1964: 1293–1301.
- WESTHUES, M. – FRITSCH, R.: *Die narkose der Tiere*. Berlin und Hamburg, Paul Parey 1960: 117–119.
- WORTHMAN, R. P.: Demonstration as specific nerve paralyses in the dog. *J.A.V.M.A.*, 131, 1957: 174–178.
- ZOBUNDŽIJA, M. – BABIĆ, K.: Primjenjena anatomija domaćih životinja. 130. Veterinarski fakultet, Skripta. Zagreb, 1985.

Arrived on 11st November 1994

---

### Contact Address:

Dr. sc. Damir Mihelić, Veterinary Faculty University of Zagreb, Heinzelova 55, 41000 Zagreb, Republic of Croatia  
Tel., fax 385 41/21 46 97, e-mail: mihelic@vef.hr

---

# ÚSTŘEDNÍ ZEMĚDĚLSKÁ A LESNICKÁ KNIHOVNA, PRAHA 2, SLEZSKÁ 7

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna v Praze (dále jen ÚZLK), která je jednou z největších zemědělských knihoven na světě, byla založena v roce 1926. Již od počátku šlo o knihovnu veřejnou. Knihovna v současné době obsahuje více než jeden milion svazků knih, cestovních zpráv, dizertací, literatury FAO, svázaných ročníků časopisů z oblasti zemědělství, lesnictví, veterinární medicíny, ekologie a dalších oborů. V letošním roce knihovna odebrá 750 titulů domácích a zahraničních časopisů. Informační prameny získané do fondu jsou v ÚZLK zpracovávány do systému katalogů – je budován jmenný katalog a předmětový katalog jako základní katalogy knihovny a dále různé speciální katalogy a kartotéky. Počátkem roku 1994 přistoupila ÚZLK k automatizovanému zpracování knihovního fondu v systému CDS/ISIS.

Pro informaci uživatelů o nových informačních pramenech ve fondech ÚZLK zpracovává a vydává knihovna následující publikace: Přehled novinek ve fondu ÚZLK, Seznam časopisů objednaných ÚZLK, Přehled rešerší a tematických bibliografií z oboru zemědělství, lesnictví a potravinářství, AGROFIRM – zpravodaj o přírůstcích firemní literatury (je distribuován na disketách).

V oblasti mezinárodní výměny publikací knihovna spolupracuje s 1 200 partnery ze 60 zemí světa. Knihovna je členem IAALD – mezinárodní asociace zemědělských knihovníků. Od září 1991 je členem mezinárodní sítě zemědělských knihoven AGLINET a od 1. 1. 1994 je depozitní knihovnou materiálů FAO pro Českou republiku.

Knihovna poskytuje svým uživatelům následující služby:

## Výpůjční služby

Výpůjční služby jsou poskytovány všem uživatelům po zaplacení ročního registračního poplatku. Mimopražští uživatelé mohou využít možností meziknihovní výpůjční služby. Vzácné publikace a časopisy se však půjčují pouze prezenčně.

## Reprografické služby

Knihovna zabezpečuje pro své uživatele zhotovování kopií obsahů časopisů a následně kopie vybraných článků. Na počkání jsou zhotovovány kopie na přání uživatelů. Pro pražské a mimopražské uživatele jsou zabezpečovány tzv. individuální reproslužby.

## Služby z automatizovaného systému firemní literatury

Jsou poskytovány z databáze firemní literatury, která obsahuje téměř 13 000 záznamů 1 700 firem.

## Referenční služby

Knihovna poskytuje referenční služby vlastních databází knižních novinek, odebíraných časopisů, rešerší a tematických bibliografií, vědeckotechnických akcí, firemní literatury, videotéky, dále z databází převzatých – Celostátní evidence zahraničních časopisů, bibliografických databází CAB a Current Contents. Cílem je podat informace nejen o informačních pramenech ve fondech ÚZLK, ale i jiné informace zajímavé zemědělskou veřejnosti.

## Půjčování videokazet

V AGROVIDEU ÚZLK jsou k dispozici videokazety s tematikou zemědělství, ochrany životního prostředí a příbuzných oborů. Videokazety zaslá AGROVIDEO mimopražským zájemcům poštou.

Uživatelům knihovny slouží dvě studovny – všeobecná studovna a studovna časopisů. Obě studovny jsou vybaveny příručkovou literaturou. Čtenáři zde mají volný přístup k novinkám přírůstků knihovního fondu ÚZLK.

## Adresa knihovny:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna  
Slezská 7  
120 56 Praha 2

## Výpůjční doba:

pondělí, úterý, čtvrtek:	9.00–16.30
středa	9.00–18.00
pátek	9.00–13.00

## Telefonické informace:

vedoucí:	25 23 92
referenční služby:	25 90 96, 25 75 41/linka 520
časopisy:	25 32 25
výpůjční služby:	25 75 41/linka 415
meziknihovní výpůjční služby:	25 75 41/linka 304
Fax:	25 70 90
E-mail:	IHOCH@uzpi.agric.cz

# IMPORTANCE OF FLIES (*DIPTERA* – *BRACHYCERA*) IN THE DISTRIBUTION OF HELMINTH EGGS FROM MUNICIPAL SEWAGE TREATMENT PLANTS

## VÝZNAM MÚCH (*DIPTERA* – *BRACHYCERA*) PRI ŠÍRENÍ VAJÍČOK HELMINTOV Z ČISTIARENSKÝCH KALOV\*

P. Juriš, I. Világiová, P. Plachý

*Parasitological Institute of the Slovak Academy of Sciences, Košice, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** Screenings were carried out in four mechanico-biological municipal wastewater treatment plants in two climatico-geographic regions of Slovakia (submontane region: Levoča, Poprad and Tatranská Lomnica, lowland region: Michalovce). Ovoscopical studies traced the occurrence of helminth eggs in stabilized sludges in sludge beds. The flies (*Diptera* – *Brachycera*) are considered as potencial biological vectors of helminth eggs. The stabilized sludges in sludge beds showed the presence of a wide range of helminth eggs *Ascaris* sp. 0–184 spec. *Hymenolepis* sp. 0–5 spec. *Toxocara* sp. 0–17 spec. *Taenia* sp. 0–2 spec. *Trichuris* sp. 0–17 spec. a *Capillaria* sp. 0–4 spec./100 g of sample dry matter. In the areas of four sewage treatment plants 461 fly specimens (358 females, 103 males) were captured, belonging to 31 species. On three specimens of *Protophormia terraenovae* ectoparasites (mites) were detected. No eggs were found on the body surface of the flies.

helminth eggs; flies (*Diptera* – *Brachycera*); epidemiology; municipal wastewater plants

**ABSTRAKT:** V rámci depistážnych vyšetrení sme na štyroch mechanicko-biologických čističkách komunálnych odpadových vôd (ČOV) z dvoch klimaticko-geografických oblastí Slovenska (podhorská oblasť: Levoča, Poprad a Tatranská Lomnica; nížinná oblasť: Michalovce) ovoskopicky zisťovali výskyt vajíčok helmintov v stabilizovaných kaloch na kalových poliach a výskyt múch (*Diptera* – *Brachycera*) ako potenciálnych prenášačov vajíčok helmintov. V stabilizovaných kaloch z kalových polí sme zisťovali širokú škálu vajíčok helmintov (*Ascaris* sp. 0–184 ex., *Hymenolepis* sp. 0–5 ex., *Toxocara* sp. 0–17 ex., *Taenia* sp. 0–2 ex., *Trichuris* sp. 0–17 ex. a *Capillaria* sp. 0–4 ex. v 100 g sušiny vzorky). V areáloch štyroch ČOV sme odchytili 461 jedincov múch (358 samičiek, 103 samčekov) patriacich k 31 druhom. Na troch jedincoch *Protophormia terraenovae* sme našli ektoparazitov (roztoc). Výskyt vajíčok helmintov na povrchu tela odchytených múch sme nezaznamenali.

vajíčka helmintov; muchy (*Diptera* – *Brachycera*); epizootológia; komunálne čističky; odpadové vody

### ÚVOD

Zvýšený hygienicko-epidemiologický záujem o dvojkrídly hmyz vyplýva zo známeho faktu, že muchy sú biologickými vektormi pôvodcov mnohých infekčných ochorení človeka i domácich zvierat (Daniel a i., 1989; Šrámová a i., 1992).

Je všeobecne známe, že na organicky znečistených miestach, ako sú kanalizácie, latríny, skládky domového odpadu, hnojiská, okolie fariem hospodárskych zvierat, maštalné priestory, kafilérie, okolie čističiek odpadových vôd ap. je spravidla vysoký výskyt múch. Tu sa súčasne vyskytuje množstvo rôznych pôvodcov infekčných ochorení. Na značnú mikrobiálnu a parazitárnu kontamináciu komunálnych odpadových vôd, kalových polí, ale aj pevných resp. tekutých odpadov z fariem hospodárskych zvierat, ako obligátnych stano-

víšť múch, sme spolu s inými autormi poukázali vo viacerých publikáciách (Juriš a i., 1991; Horák, 1992; Venglovský a i., 1992; Plachý a Juriš, 1994; Ondrašovič a i., 1994; Novák a i., 1994 a inf).

Náš výskum sme sústredili na problematiku epidemiologického významu múch (*Diptera* – *Brachycera*) pri prenose vajíčok parazitických červov z kalových polí pri komunálnych čistiarniach odpadových vôd.

### MATERIÁL A METÓDY

Čistiarenské kaly o hmotnosti 100 g (priemerná vzorka z kalového poľa – 1 000 g) sme vyšetrovali metódou podľa Čerepanova (1982), ktorá je modifikáciou motódy podľa Romanenka (1968). Metóda je založená na princípe sedimentácie a flotácie nasýteným

\* Výsledky boli získané pri riešení grantu 2/2078/95 Grantovej agentúry pre vedu.

roztokom sacharózy mernej hmotnosti 1,30. Vyfotované vajíčka helmintov sme zachytávali na sklenú platničku s rozmermi 5 x 5 cm a diagnostikovali pomocou svetelného mikroskopu.

Odchyt dvojkřídlcov v areáloch komunálnych čistiarní odpadových vôd sme vykonávali za slnečného počasia a bezvetria v čase ich maximálneho výskytu v mesiacoch júl a august. Odchyt sme vykonávali dvojakým spôsobom, na návnady a do entomologických sietí. Muchy boli usmrčované éterom, každý jedinec bol determinovaný pod mikroskopom a prehliadnutý na prítomnosť vajíčok helmintov na povrchu tela.

## VÝSLEDKY

Výsledky vyšetrení kontaminácie kalových polí vajíčkami helmintov sú uvedené v obr. 1. Vo vyšetrovaných vzorkách sa vyskytovali vajíčka nasledovných rodov resp. druhov: *Ascaris* sp., *Toxocara* sp., *Hymenolepis* sp., a *Trichuris* sp. v intenzite od 0–184 ex. v 100 g sušiny kalu.

V okolí kalových polí pri komunálnych čistiarniach odpadových vôd sme odchytili 461 jedincov (358 samičiek a 103 samčekov) dvojkřídlcov (*Diptera* – *Brachycera*) patriacich do 10 čefadí a 31 druhov. Ich kvalitatívne a kvantitatívne zastúpenie je uvedené v tab. I.

V odchytenom súbore múch sú dominantne zastúpené jedince z čefade *Muscidae*, *Calliphoridae* a *Sarcophagidae*. Vyskytli sa tu aj zástupcovia patriaci do systematicky nižších čefadí, ako sú *Psychodidae*, *Syrphidae*,

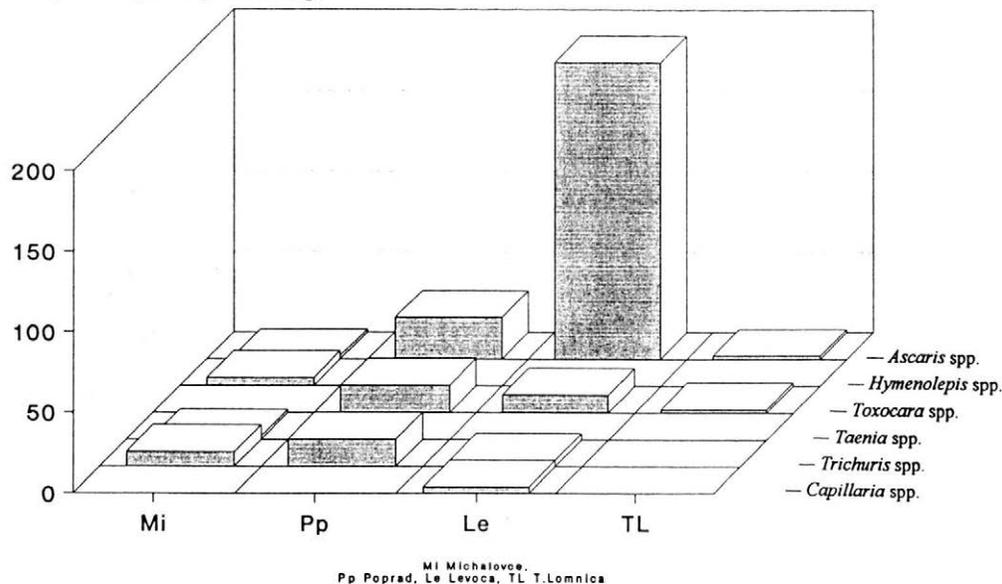
*Ulidiidae* a *Anthomyiidae*. Z čefade *Muscidae* sa vyskytli okrem eusynantropnej *Musca domestica* aj ďalšie dve pastviskové synbovlné druhy (*M. autumnalis*, *M. osiris*). Zástupcovia rodu *Muscina* sa vyskytujú voľne v prírode. Druh *Muscina stabulans* je však eusynantropný, zaletujúci až do ľudských obydľí. Ostatné dva druhy (*M. levida*, *M. prolapsa*) sú hemisynantropné. Do čefade *Muscidae* patrí aj rod *Hydrotaea*, ktorý bol v našom súbore zastúpený druhmi *H. dentipes*, *H. floccosa*, *H. meteorica*. Z čefade *Sarcophagidae* reprezentovanej piatimi druhmi je najznámejšia *Sarcophaga carnaria* (mäsiarka obyčajná). V odchytenom súbore múch mal z aspektu hygieny a epidemiológie najväčší význam druh *Lucilia sericata*, ktorý sa tu vyskytol aj v najväčšom počte.

U troch jedincov druhu *Protophormia terraenovae* sme na ich povrchu (v oblasti abdomena) zistili roztoče. Išlo o nymfy – šesťnohé vývinové štádiá roztočov, ktoré vyhľadávajú muchy. Tie im zabezpečujú ďalšie rozširovanie sa v prírode. Výskyt roztočov na synantropných muchách nie je častým javom, dáva sa však do súvislosti s ich synantropizáciou. Vajíčka helmintov, ktoré sme pravidelne diagnostikovali vo vzorkách stabilizovaných kalov z kalových polí, sa na povrchu tela odchytených múch nezistili.

## DISKUSIA

Úlohou výskumu bolo zistiť stupeň kontaminácie kalových polí vajíčkami helmintov a určiť zloženie populácie múch v areáloch sledovaných ČOV, v súvislosti

Priemerný počet v 100 g sušiny kalu  
Average number per 100 g of dried sludge



I. Vajíčka helmintov v stabilizovaných kaloch – Helminth eggs in stabilized sludges

Druhy múch <sup>1</sup>	Počet <sup>2</sup>	
	samičky <sup>3</sup>	samčeky <sup>4</sup>
Psychodidae	7	4
Syrphidae		
<i>Eristalis tenax</i> (Linné, 1758)		1
<i>Eumeris</i> sp.	1	
Ulidiidae		
<i>Phystophora demandata</i> (Fallén, 1817)	22	
Biophilidae		
<i>Parapiophila vulgaris</i> (Fallén, 1820)	2	
Anthomyiidae		
<i>Delia</i> sp.	3	
Anthomyiidae spp.	12	2
Fanniidae		
<i>Fannia canicularis</i> (Linné, 1761)	10	
<i>Fannia manicata</i> (Meigen, 1826)	6	
Muscidae		
<i>Musca domestica</i> (Linné, 1758)	24	7
<i>Musca autumnalis</i> (Le Geer, 1776)		6
<i>Musca osiris</i> (Wiedermann, 1830)		1
<i>Muscina stabulans</i> (Fallén, 1817)	7	
<i>Muscina prolapsa</i> (Harris, 1780)	2	
<i>Muscina levida</i> (Harris, 1780)	1	
<i>Hydrotaea ignava</i> (Harris, 1780)	3	
<i>Hydrotaea dentipes</i> (Fabricius, 1805)	13	
<i>Hydrotaea meteorica</i> (Linné, 1758)	17	2
<i>Hydrotaea floccosa</i> (Macquart, 1835)	20	
Calliphoridae		
<i>Lucilia sericata</i> (Meigen, 1826)	140	41
<i>Lucilia caesar</i> (Linné, 1758)	16	13
<i>Lucilia silvarum</i> (Meigen, 1826)	1	
<i>Calliphora vicina</i> (Robineau-Désvoidy, 1830)	1	4
<i>Cynomia mortuorum</i> (Linné, 1761)	1	
<i>Pollenia rudis</i> (Fabricius, 1794)	17	
<i>Phormia regina</i> (Meigen, 1826)		2
<i>Protophormia terraenovae</i> (Robineau-Désvoidy, 1830)	21	1
Sarcophagidae		
<i>Helicophagella melanura</i> (Meigen, 1826)		4
<i>Helicophagella</i> sp.	1	
<i>Parasarcophaga albiceps</i> (Meigen, 1826)		1
<i>Sarcophaga carnaria</i> (Linné, 1758)	3	
<i>Sarcophaginae</i> gen. sp.	10	6
Tachinidae		5
Spolu <sup>5</sup>	358	103

<sup>1</sup>fly species, <sup>2</sup>number, <sup>3</sup>females, <sup>4</sup>males, <sup>5</sup>total

s ich epidemiologickým významom pri šírení helmintóz v životnom prostredí. Pri zostavovaní vyššie uvedeného cieľa práce sme vychádzali z viacerých literárnych údajov. Zaujímavé sú informácie Rosického a i. (1994) o úlohe synantropných múch v epidemiológii. Autori uvádzajú, že na prenose salmonel z hnojísk, fekálií a rôznych organických odpadov sa podieľajú exofílné, fakultatívne endofílné a obligátne endofílné formy synantropných múch. Súčasne však upozorňuje na problém nízkej populačnej hustoty synantropných múch a na otázku schopnosti transportu dostatočného množstva salmonel, ktoré je potrebné k vyvolaniu infekcie. Na nutnosť vykonania tohto prieskumu nás okrem iných informačných zdrojov upozornila citácia vyššie uvedených autorov. Uvádza sa tu tiež, že synantropné muchy prenášajú pôvodcov infekčných, ale aj parazitárnych ochorení.

Z nášho prieskumu vyplynulo, že v súbore 461 jedincov múch z areálov ČOV sme na ich povrchu nezistili výskyt vajčiek helmintov. Najmä hrubostenné vajčeka parazitických nematódov, ktoré sme v kalových poliach pravidelne diagnostikovali (*Ascaris* sp., *Toxocara* sp. a pod.) majú schopnosť prichytávať sa svojim bielkovinovým obalom. Náš negatívny nález však nevyklučuje možnosť mechanického prenosu vajčiek geohelmintov pomocou biologických vektorov. Odchyty múch sa vykonávali v letnom období, kedy vplyvom vysokých teplôt dochádzalo k rýchlemu vysušovaniu kalových polí. Na ich povrchu sa potom vytvárala kôra, ktorá zabraňovala mechanickému prenosu vajčiek. Ďalším z faktorov prenosu je stupeň kontaminácie kalového poľa vajčkami helmintov.

Prenos vajčiek helmintov v životnom prostredí prostredníctvom múch sa môže uskutočňovať aj po vyskladnení organických zvyškov kalového poľa. Plachý a Juriš (1995) uvádzajú, že niektoré vajčeka helmintov sa vyznačujú vysokou tenacitou (*Ascaris* sp.) aj v prostredí kalových polí. Aj po 320 dňoch tu prežije viac ako 36 % vajčiek. Hygienicko-epidemiologický problém môže vzniknúť vtedy, ak sa organická hmota kalových polí kontaminovaná vajčkami helmintov používa v poľnohospodárskej krajine k hnojným účelom už po krátkom čase (asi šesť mesiacov).

Výsledky nášho výskumu nevyklučujú možnosť mechanického prenosu vajčiek geohelmintov muchami. Súčasne však nepredpokladáme, že by synantropné muchy hrali významnú úlohu pri šírení geohelmintóz v životnom prostredí. Z aspektu parazitologického niektoré druhy múch zistené i v našom súbore (*Musca autumnalis*, *M. osiris*) majú dôležitý význam pri šírení biohelmintózy – telaziózy u hovädzieho dobytku (*Thelazia rhodesi*, *T. gulosa*, *T. skrjabini*) (Világievová, 1969; Čorba, 1969, 1970).

V odchytnom súbore múch boli zastúpené aj menej významné, druhy z pohľadu hygieny a epidemiológie. Napríklad druhy *Hydrotaea dentipes*, *H. floccosa*, *H. meteorica* sa podľa našich zistení vyskytujú na pastviskách, kde vyhľadávajú hovädzí dobytok, ale nemajú väčší epizootologický význam.

Z hľadiska schopnosti prenášať patogénne mikróby sú veľmi nebezpečné najmä druhy *Lucilia sericata*, *L. ceasar*, *Musca domestica*, *Calliphora vicina*, *Fannia canicularis* a *Muscina stabulans*. Z nich boli izolované rôzne patogénne resp. podmienené patogénne mikróby ako napr. *E. coli*, salmonely, stafylokoky, streptokoky, pneumokoky a pod. (Gregor a Povolný, 1961).

#### PodĎakovanie

Ďakujeme Ing. Dr. Františkovi Gregorovi, CSc. za determináciu niektorých druhov múch.

#### LITERATÚRA

ČEREPANOV, A. A.: Instrukcia po laboratornomu kontrolju čistných sooruzenij na životnovodčeských kompleksach. Moskva, Kolos 1982.

ČORBA, J.: K sezónnej dynamike invázneho cyklu oftalmohelminťov hovädzieho dobytku rodu *Thelazia*. Veterinářství, 12, 1969: 539–541.

ČORBA, J.: Použitie receptorov na ochranu očí hostiteľa proti medzihostiteľovi telázif. Vet. Čas. (Košice), 13, 1970: 59–63.

DANIEL, M. – KOVÁČOVÁ, D. – ROSLEROVÁ, V. – ZUZKA, J.: Význam synantropních much a ďalšího hmyzu pro kontaminaci prostředí zdravotnických zařízení. Zpr. Českoslov. Spol. Parazit., 2, 1989: 35.

GREGOR, F. – POVOLNÝ, D.: Versuch einer Klassifikation der synantropen Fliegen. J. Hyg. Epidem. Mikrobiol. Immunol., 2, 1958: 203–216.

HORÁK, P.: Helminth eggs in the sludge from three sewage treatment plants in Czechoslovakia. Folia Parasit., 39, 1992: 153–157.

JURIŠ, P. – BREZA, M. – SCHMIDTOVÁ, D. – VENGLOVSKÝ, J.: Diseminácia a prežívanie zárodkov endopa-

razitov v životnom prostredí. Veter. Med. (Praha), 36, 1991: 665–671.

NOVÁK, P. – LUKEŠOVÁ, D. – KUBÍČEK, K. – FIŠER, A.: Studium účinnosti čistírny odpadních vod z mikrobiologického a parazitologického hlediska. In: Zbor. Ref. Ved. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 1994: 65–68.

ONDRAŠOVIČ, M. – ONRAŠOVIČOVÁ, O. – VARGOVÁ, M. – PARA, E. – BODNÁR, P.: Chemical and microbiological examination of rendering plant wastewaters. In: Proc. 8th Int. Congr. on Animal Hygiene, St. Paul, Minnesota, USA, 1994: 104–107.

PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Riziká prenosu zárodkov helmintov čistiarenskými kalmi na poľnohospodársku pôdu. Slov. Vet. Čas., 19, 1994: 15–18.

PLACHÝ, P. – JURIŠ, P.: Prežívanie vajčiek modelového helminta *Ascaris suum* na kalových poliach čistiarní odpadových vôd. Vet. Med. – Czech, 40, 1995: 35–39.

ROMANENKO, N. A.: Metod issledovanija počvy i osadka stočnych vod na jajca gefmintov. Med. Parazit. Bolez., 6, 1968: 723–729.

ROSICKÝ, B. – SIXL, W. a kol: Salmonelózy. Sci. Med. (Praha), 1994.

ŠRÁMOVÁ, H. – DANIEL, M. – ABSOLONOVÁ, V. – DĚDIČOVÁ, D. – JEDLIČKOVÁ, Z. – LHOTOVÁ, H. – PETRÁŠ, P. – SUBERTO VÁ, V.: Epidemiological role of arthropods detectable in health facilities. J. Hosp. Infect., 20, 1992: 281–292.

VENGLOVSKÝ, J. – VARGOVÁ, M. – CHANDOGA, P. – PAČAJOVÁ, Z.: Possibilities of utilization of aerobic and anaerobic treatment processes in hygienization of agricultural wastes. In: Zbor. Ref. Ved. Konf. Ekológia a veterinárna medicína, Košice, 1992: 52–53.

VILÁGIOVÁ, I.: Štúdium životného cyklu telázif hovädzieho dobytku. [Doktorská rigorózna práca.] Praha 1969.

Došlo 5. 4. 1995

---

#### Kontaktná adresa:

MVDr. Peter Juriš, CSc., Parazitologický ústav SAV, Hlinkova 3, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. 095/633 14 11–13, fax 095/633 14 14

---

# EFFECT OF FATTY ACID COMPOSITION, CADMIUM AND VITAMIN E INTAKE ON PROOXIDATIVE-ANTIOXIDATIVE STATE OF RAT LIVER

## VPLYV ZLOŽENIA MASTNÝCH KYSELÍN, PRÍJMU KADMIA A VITAMÍNU E NA PROOXIDAČNO-ANTIOXIDAČNÝ STAV PEČENE POTKANOV

M. Krajčovičová-Kudláčková, E. Ozdín

*Research Institute of Nutrition, Bratislava, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** The effect of cadmium intake (100 µg/kg body weight/day as cadmium chloride over a period of three months) on the prooxidative-antioxidative state of liver was studied in 30 days old weaned male rats. Animals were fed a nutritionally balanced lacto-vegetable diet containing high-quality amino acid mixture (casein + gluten 1 : 1), lipids in form of either pork fat PF (% of polyunsaturated fatty acids PUFA = 11.9; unsaturation index UI = 72), margarine MA (% PUFA = 21.9; UI = 98), or soybean oil SO (% PUFA = 61.2; UI = 156) and vitamin E at amount of 60 mg/kg of food (groups PF, PF + Cd, MA, MA + Cd, SO, SO + Cd) or 600 mg (groups PF + Cd + E, MA + Cd + E, SO + Cd + E) in form of  $\alpha$ -tocopheryl acetate. The following parameters were measured: conjugated dienes of fatty acids (CD), activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) (as relative generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and glutathione peroxidase (GSH-Px). A direct relation between lipoperoxidation values and unsaturation index of lipids was found both in spontaneous (PF, MA, SO – control) and cadmium-induced generation of free oxygen radicals. Cadmium intake resulted in a disbalance in prooxidative-antioxidative processes which was manifested in a significant increase of CD in all fat sources (the degree of increase was directly proportional to UI and PUFA), in similar values of relative H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation and in a nonsignificant increase of GSH-Px in animals with most developed lipoperoxidation (SO). A tenfold increase in the administered dose of vitamin E restored a prooxidative-antioxidative equilibrium disturbed by cadmium intake in the liver of rats fed the diet with animal fat (PF + Cd + E) and margarine (MA + Cd + E) (reduction of CD to the level of control groups, decrease of relative generation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – significant in MA). In animals fed with soybean oil, a vitamin E – induced reduction of CD was significantly over the control level simultaneously with significant stimulation of GSH-Px activity. No changes in H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> generation together with CD levels and GSH-Px activity indicated that a synergic effect of several antioxidants is essential in the case of high lipoperoxidation. Presented results are important with respect to possible control or regulation of the equilibrium between prooxidative and antioxidative processes by nutrition.

cadmium; vitamin E; pork fat; margarine; soybean oil; young rats; liver; conjugated dienes of fatty acids; superoxide dismutase; catalase; glutathione peroxidase

**ABSTRAKT:** Na odstavených potkanoch, samcoch, veku 30 dní sa študoval 3-mesačný vplyv príjmu kadmia (100 µg/kg telesnej hmotnosti/deň; ako chlorid kademnatý) na prooxidačno-antioxidačné parametre v pečeni. V podmienkach na živiny vyváženej mliečno-rastlinnej potravy s kvalitnou aminokyselinovou zmesou (kazeín + glutén 1 : 1), so zdrojom tukov bravčová masť PF (% polynenasýtených mastných kyselín PUFA = 11,9; index nenasýtenosti UI = 72), margarín MA (% PUFA = 21,9; UI = 98), sójový olej SO (% PUFA = 61,2; UI = 156) a príjmom vitamínu E 60 mg/kg potravy (skupiny PF, PF + Cd, MA, MA + Cd, SO, SO + Cd) a 600 mg E (vo forme  $\alpha$ -tokoferolacetátu)/kg (skupiny PF + Cd + E, MA + Cd + E, SO + Cd + E). Boli merané: konjugované diény mastných kyselín CD, aktivita superoxididmutázy SOD, katalázy CAT (relatívna tvorba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a glutatióperoxidázy GSH-Px. Zistila sa priama závislosť hodnôt lipoperoxidácie na indexe nenasýtenosti tukov u spontánnej (PF, MA, SO) aj kadmíom indukovanej tvorby voľných kyslíkových radikálov. Príjem kadmia mal za následok vznik nerovnováhy v prooxidačno-antioxidačných pochodoch v zmysle významného zvýšenia CD u všetkých tukových zdrojov (miera zvýšenia priamo úmerná UI a PUFA), rovnakých hodnôt relatívnej tvorby H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a nevýznamného nárastu aktivity GSH-Px u najviac rozvinutej lipoperoxidácie (SO). Desiatnásobný príjem vitamínu E upravil vplyvom kadmia narušenú prooxidačno-antioxidačnú rovnováhu v pečeni potkanov kŕmených živočišným (PF + Cd + E) a stuženým (MA + Cd + E) tukom (pokles CD na úroveň kontroly, pokles relatívnej tvorby H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – u MA významný). U zvierat na sójovom oleji bol pokles CD vplyvom podávaného vitamínu E významne nad úroveň kontroly pri významne zvýšenej aktivite GSH-Px. Nezmenená relatívna tvorba H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> poukazuje spolu s hodnotami CD a GSH-Px, že u vysokej miery lipoperoxidácie je potrebné synergické pôsobenie viacerých antioxidantov. Výsledky sú významné z hľadiska možností nutričného ovplyvnenia resp. regulácie rovnováhy prooxidačno-antioxidačných pochodov.

cadmium; vitamín E; bravčová masť; margarín; sójový olej; rastúce potkany; pečeň; konjugované diény mastných kyselín; superoxididmutáza; kataláza; glutatióperoxidáza

## INTRODUCTION

Vegetarian nutrition can eventually impose certain health risk related to cadmium intake. Cadmium accumulates in outer grain layers. By consuming products consisting of coarse-ground flour, vegetarians can be exposed to a risk of ingestion of deleterious amounts of this metal ion (Dwyer, 1988). Cadmium is one of the factors involved in generation of free oxygen radicals (Halliwell and Gutteridge, 1984; Misra et al., 1990).

Reactive products of oxygen metabolism and toxic products of lipoperoxidation generated by their activity play a role in the etiology of several age-related disorders and diseases, like cardiovascular diseases (Gey, 1989, 1992, 1993), oncological diseases (Sun, 1990; Stähelin et al., 1989), diabetes and others (Sies, 1991). Vegetarian nutrition is characterized by higher intake of polyunsaturated fatty acids resulting in higher plasma levels (Krajčovičová-Kudláčková et al., 1994a, 1995a) and these substances are particularly sensitive to an attack by free oxygen radicals.

The control over the levels of toxic intermediates of oxygen metabolism is provided by protective mechanisms that include antioxidant enzymes, non-essential endogenous antioxidants and essential radical scavengers (Sun, 1990; Sies, 1991). The group of essential antioxidants consists of vitamin E,  $\beta$ -carotene, vitamin A and vitamin C (Frei, 1991; di Macio et al., 1991).

In the study presented here we investigated a prooxidative-antioxidative state of rat liver. Cadmium intake and lipid content in a balanced lacto-vegetable food with diverse unsaturation index and different content of polyunsaturated fatty acids is analogous to the situation in vegetarian nutrition. Increased intake of an antioxidant (10-fold increase of vitamin E over the control group) is also similar to the situation of vegetarians (Krajčovičová-Kudláčková et al., 1994b). Conjugated dienes of fatty acids (the first product of lipoperoxidation) were estimated as the prooxidative parameter and relative generation of  $H_2O_2$  (activity of superoxide dismutase SOD/activity of catalase CAT) and the activity of glutathione peroxidase GSH-Px were chosen as indicators of the antioxidant enzyme status.

## MATERIAL AND METHODS

The experiment was started on male rats (Wistar strain, breeding station Velaz, Praha) of the initial age 30 days and body weight  $66 \pm 6$  g. Animals were fed for 90 days a diet with optimal nutrient composition (Krajčovičová-Kudláčková, 1990). A combination of vegetable and animal (milk) nutrition was provided by a 1 : 1 mixture of animal milk protein concentrate (casein) and wheat proteins (gluten) in an optimal protein dosage (NRC, 1978; standard labora-

tory diet). Calculation of the optimal dosage of gluten relative to casein was described by Krajčovičová-Kudláčková and Ozdín (1993). Amino acid mixture in gluten and casein (1 : 1) had a high biological value (BVp = 83) and a high amino acid score of the limiting amino acid AS (Met + Cys/2) = 69 (Krajčovičová-Kudláčková and Bobek, 1994). Following ingredients were used as fat sources: pork fat PF (unsaturation index UI = 72, content of polyunsaturated fatty acids PUFA = 11.9), margarine MA (UI = 98, PUFA = 21.9) and soybean oil SO (UI = 156, PUFA = 61.2) – Tab. I. Saccharose and wheat starch (1 : 6.2) were used as carbohydrate sources. Composition of the diet was as follows (in g/kg): casein 60, gluten 90, fat 120, saccharides 500, mineral salt mixture 40, agar 190. A standard vitamin mixture was added to the diet just before the daily administration to the animals.

Each experimental group consisted of 8 animals. The control groups were fed a diet with PF, MA or SO as a lipid source and were labelled as PF, MA, SO. Other groups (PF + Cd, MA + Cd, SO + Cd) received daily 100  $\mu$ g of cadmium per kg of body weight in form of cadmium chloride dissolved in a small volume of

I. Composition of dietary fats

g/100g	PF	MA	SO
Total lipids	99.7	82.0	99.9
Triacylglycerols	99.2	81.4	99.2
Phospholipids	0.33	–	–
$\beta$ -sitosterol	–	0.04	0.30
Cholesterol	0.10	–	–
Fatty acids	95.8	78.1	94.9
% of total fatty acids			
10 : 0	0.1	traces	–
12 : 0	0.6	traces	–
14 : 0	1.4	0.4	traces
16 : 0	25.3	12.1	10.6
18 : 0	13.0	9.2	4.0
20 : 0	0.8	1.4	0.6
22 : 0	–	0.3	0.5
16 : 1	2.6	1.2	0.2
18 : 1	43.4	51.9	21.2
20 : 1	–	1.3	0.6
22 : 1	–	traces	–
18 : 2	10.0	20.7	53.6
18 : 3	1.4	–	7.6
20 : 2	–	1.2	1.8
20 : 4	0.5	–	–
Saturated	41.2	23.4	15.7
Monounsaturated	46.0	54.4	22.0
Polyunsaturated	11.9	21.9	61.2
Polyunsaturated/saturated	0.26	0.94	3.90
Unsaturation index	72	98	156

PF = pork fat, MA = margarine, SO = soybean oil

drinking water. Drinking water was filled up when cadmium solution was consumed. The third group (PF + Cd + E, MA + Cd + E, SO + Cd + E) received in the diet a higher dose of vitamin E in addition to cadmium (100 µg/kg of body weight). Normal dose of vitamin E for the control and cadmium groups was 60 mg (in form of  $\alpha$ -tocopheryl acetate) per kg of diet with each fat source; groups with higher vitamin E intake were fed a diet fortified with 600 mg of vitamin E/kg (Murray, 1991).

Animals were kept individually in cages with mesh floor. All regulations for animal breeding were followed. Consumption of food was controlled daily and body weight was determined every week. Food and water were administered *ad libitum*, except of the last day of experiment when the animals were fasted for 16 hours before decapitation.

After decapitation of animals, liver was withdrawn, chilled quickly and samples were taken for the estimation of lipoperoxidation and of the antioxidant enzyme activities. Conjugated dienes of fatty acids CD were measured according to Recknagel and Glende (1984). Activity of superoxide dismutase SOD (E.C.1.15.1.1) was estimated with a commercial kit (Randox Lab. Ltd.) and catalase activity CAT (E.C.1.11.1.6) by the method of Cavarocchi et al. (1986). Activity of glutathione peroxidase GSH-Px (E.C.1.11.1.9) was measured according to Paglia and Valentine (1967).

## RESULTS

Characteristics of the used fat sources are shown in Tab. I. Pork fat (PF) as an animal fat has a high content of saturated fatty acids and is poor in polyunsaturated fatty acids. Therefore its unsaturation index is low. Margarine (MA) has an increased content of polyunsaturated fatty acids when compared to pork fat, it does not contain any linolenic acid C 18 : 3 (fat hardening) and has the highest content of oleic acid C 18 : 1 (mainly from rapeseed oil, low in erucic acid C 20 : 1). Compared to pork fat, margarine has a double content of linoleic acid C 18 : 2, total content of saturated fatty acids reduced to a half and a threefold higher ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids. Similarly, the unsaturation index is increased. Soybean oil (SO) as a typical plant oil has a high content of polyunsaturated fatty acids, with 53.6% of total fatty acids being linoleic acid and 7.6% linolenic acid. The content of monoenes and saturated fatty acids is the lowest of all fat sources used. Soybean oil has a high unsaturation index and high ratio of polyunsaturated to saturated fatty acids – increased by a factor of 15 and 4 when compared to pork fat and margarine, respectively.

Tab. II presents the values of the first product of lipoperoxidation in the liver – conjugated dienes (CD) of fatty acids. CD in the control groups fed individual fat sources (PF, MA, SO) reflected the corresponding content of polyunsaturated fatty acids. Compared to PF

II. Content of conjugated dienes of fatty acids (CD) in the liver of rats

Generation of free oxygen radicals					
spontaneous (control)		cadmium induced		cadmium induced + vitamin E	
groups	CD (D/g)	groups	CD (D/g)	groups	CD (D/g)
PF	6.53 ± 0.36	PF + Cd	8.63 ± 0.32 <sup>2</sup>	PF + Cd + E	6.27 ± 0.25 <sup>Z</sup>
MA	7.69 ± 0.21 <sup>A</sup>	MA + Cd	14.72 ± 0.65 <sup>3</sup>	MA + Cd + E	8.65 ± 0.33 <sup>1,Z</sup>
SO	9.81 ± 0.46 <sup>C</sup>	SO + Cd	26.16 ± 1.26 <sup>3</sup>	SO + Cd + E	14.13 ± 0.92 <sup>3,Z</sup>

± = standard error of the mean

A, B, C = in control groups (MA, SO vs. PF)

1, 2, 3 = cadmium induced groups and cadmium induced + vitamin E groups vs. control groups

X, Y, Z = cadmium induced + vitamin E groups vs. cadmium induced groups

A, 1 =  $P < 0.05$ ; 2 =  $P < 0.01$ ; C, 3, Z =  $P < 0.001$

III. Activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px) in rat liver

	SOD	CAT	SOD/CAT	GSH-Px
	(U/g)	(U/g)		(U/g)
PF + Cd	1 386 ± 48	735 ± 40	1.88 ± 0.07	28.2 ± 1.8
PF + Cd + E	1 299 ± 36	743 ± 22	1.74 ± 0.05	26.3 ± 1.3
MA + Cd	1 428 ± 42	732 ± 28	1.95 ± 0.06	27.3 ± 2.0
MA + Cd + E	1 346 ± 51	764 ± 32	1.76 ± 0.06 <sup>X</sup>	31.0 ± 1.7
SO + Cd	1 345 ± 38	687 ± 17	1.96 ± 0.06	36.2 ± 3.2
SO + Cd + E	1 411 ± 41	702 ± 30	2.01 ± 0.08	45.3 ± 2.4 <sup>Y</sup>

+ Cd = cadmium induced generation of free oxygen radicals

+ Cd + E = cadmium induced generation of free oxygen radicals + vitamin E

X, Y, Z = + Cd + E groups vs. + Cd groups

x =  $P < 0.05$ , Y =  $P < 0.01$

group, the increase in MA was on the limit of significance and the increase in SO was significant. Cadmium intake caused a significant increase in the content of conjugated dienes in all three types of fats (PF + Cd, MA + Cd, SO + Cd) and a direct correlation with the content of polyunsaturated fatty acids in the diet was observed. A tenfold increase in the dose of vitamin E, applied simultaneously with cadmium, caused a significant reduction in CD compared to groups with the low vitamin E dose. However, control levels were reached only in the group fed with pork fat. The reduction of CD was slightly above the control for margarine ( $P < 0.05$ ) and highly significant over the control group for soybean oil ( $P < 0.001$ ).

Activities of antioxidant enzymes in groups receiving cadmium  $\pm$  vitamin E are shown in Tab. III. Important information is provided by the evaluation of activities using the relative generation of  $H_2O_2$  (SOD/CAT). This parameter was at the same level in all groups supplemented by cadmium and normal vitamin E dose. Increased vitamin E intake caused a reduction of  $H_2O_2$  generation in groups fed PF and MA (significant in the latter case). The value of SOD/CAT in soybean oil was the same for groups SO+Cd and SO + Cd + E. The activity of GSH-Px did not change significantly in PF and MA groups (with only slight increase in MA). On the contrary, for SO fed animals the activity of this enzyme increased significantly in group SO + Cd + E compared to SO + Cd.

## DISCUSSION

Disturbed equilibrium between the generation of reactive oxygen products and their neutralization by the processes of detoxification results in oxidative damage of membranes and in defects of the integrity of subcellular organelles (Bowles et al., 1991). Aggressive oxygen radicals can cause damage to all biochemical components of the cell (DNA, RNA, proteins, saccharides, unsaturated lipids, micronutrients). Peroxidation of unsaturated fatty acids is initiated by the effect of reactive radical that tears off hydrogen atom from methylene groups in carbon chains. Carbonyl radical is stabilized by shifts in double bond pattern producing conjugated diene as the first product of lipoperoxidation. Peroxidation results in the depletion of unsaturated fatty acids in membranes which causes loss of their integrity and dysfunction of receptors. Toxic products of lipoperoxidation inhibit proteosynthesis and enzyme activities. They are responsible for the induction of several disorders and diseases, including processes of atherogenesis and carcinogenesis, as already mentioned in the section Introduction.

A daily dose of 100  $\mu$ g of cadmium per kg of body weight induces cadmium intoxication in rats after 6 months (Veranjan et al., 1989). Low protein content in the diet increases the toxicity of cadmium after oral administration while a balanced diet reduces both

cadmium absorption and toxicity. In our experiment, animals were fed a lacto-vegetable diet balanced in nutrients with a content of limiting amino acid that was favourable with respect to the intensity of proteosynthesis (Krajičovičová - Kudláčková and Bobek, 1994). This diet was analogous to the proper lacto-vegetarian diet also in the content of fat, with the predominance of polyunsaturated fatty acids. To estimate the dependence of spontaneous and exogenously stimulated lipoperoxidation on the intake of fats differing in variable unsaturation index, we included a diet containing animal fat in addition to the diets with margarine and soybean oil, respectively (analogous to lacto-vegetarian nutrition). A direct relation between lipoperoxidation values and the content of polyunsaturated fatty acids was found in spontaneous and cadmium-induced lipoperoxidation. Compared to animals fed with pork fat, the increase in conjugated dienes produced by spontaneous lipoperoxidation was enhanced 1.2 times in the liver of animals receiving margarine and 1.5 times in animals receiving soybean oil. When the generation of free oxygen radicals was stimulated by cadmium intake, the level of lipoperoxidation increased in the liver of animals fed margarine 1.7 times and in animals fed soybean oil 3.1 times. This finding is significant with respect to potentially increased intake of cadmium in vegetarian nutrition. During our investigation of the nutritional and health status of the vegetarian population ( $n = 257$ ) we did not register any increase in lipoperoxidation. This could be probably explained by favourable antioxidative parameters in vegetarians – significantly higher plasma levels of vitamin C,  $\beta$ -carotene, vitamin E, vitamin A, and of selenium – compared to the population with normal nutrition (Krajičovičová - Kudláčková et al., 1994d, 1995a).

Cadmium-stimulated relative generation of  $H_2O_2$  was similar for all three fat sources. This indicates that the process of lipoperoxidation depends predominantly on the availability of substrates, i. e. on the content of polyunsaturated fatty acids, and not on the amount of free radicals. Similarly, Rojas et al. (1993) and Salvati et al. (1993) considered the unsaturation index and the content of polyunsaturated fatty acids as major factors contributing to the sensitivity to lipid peroxidation. Glutathione peroxidase is specific both for  $H_2O_2$  and lipid hydroperoxides (Himeno et al., 1993). Consequently, we found the increase of its activity in the liver of animals maintained on the soybean oil diet, where the level of lipoperoxidation was high.

Vitamin E is one of essential radical scavengers. It is characterized as a chain-breaking antioxidant in lipid-soluble phase (Di Maccio et al., 1991). The most important attribute of vitamin E is its ability to react with lipid peroxyradicals thus inhibiting peroxidation before generation of conjugated dienes (Fuzukawa et al., 1985; Tiidus et al., 1993). High biological activity of  $\alpha$ -tocopherol is determined by its ability to quench singlet oxygen. High cytotoxicity of singlet oxygen can be attributed to its behaviour as an aggres-

sive oxidant of unsaturated lipids, proteins, amino acids, cholesterol and of other biologically important substrates (Ge y, 1993).

Undesirable prooxidative-antioxidative parameters in the liver of rats treated with cadmium were restored by the 10-fold elevated intake of vitamin E. Complete restoration of the equilibrium between generation of toxic products of oxygen metabolism and processes leading to their detoxification was achieved in groups fed diets with pork fat and margarine, respectively (reduction of conjugated dienes to the control level for animal fat and close to the limit of significance ( $P < 0.05$ ) for hardened fat, reduced relative generation of  $H_2O_2$  which was statistically significant for margarine together with an insignificant increase of GSH-Px activity). In animals fed the diet with soybean oil the equilibrium between prooxidative and antioxidative processes in the liver was not achieved (decrease in conjugated dienes significantly above the control level -  $P < 0.001$ , no change in relative generation of  $H_2O_2$ , significantly higher activity of GSH-Px). Increased activity of GSH-Px was not sufficient for a significant reduction of lipoperoxidation. Higher intake of vitamin E could not restore the prooxidative-antioxidative equilibrium in the case of highly developed peroxidation induced by the composition of soybean oil. These results are in agreement with those presented by Nardini et al. (1993), who found increased lipoperoxidation of liver microsomes in animals fed for 6 weeks a diet with soybean oil compared to animals fed olive oil (UI = 94.5) and coconut oil (UI = 14.4) at the same dose of vitamin E in diets. Microsomes of animals fed olive oil and coconut oil revealed higher protection against lipid peroxidation. A limitation to soybean oil only in the diet would be an extreme situation in human vegetarian nutrition. In addition, the effect of vegetarian nutrition involves both the intake and higher plasma levels of all antioxidant compounds compared to non-vegetarians (Krajčovičová-Kudláčková et al., 1995b).

## CONCLUSIONS

We have found a direct correlation between lipoperoxidation values (conjugated dienes of fatty acids CD) in rat liver and the degree of unsaturation of dietary fat in the case of both spontaneous lipoperoxidation and lipoperoxidation induced by cadmium intake. Increase in CD caused by cadmium was more pronounced. Relative generation of  $H_2O_2$  in exogenous stimulation of free oxygen radical generation was the same for pork fat PF, margarine MA and soybean oil SO as fat sources, with just an insignificant increase of GSH-Px activity in the case of SO. A 10-fold increase of vitamin E intake (together with cadmium intake) restored the equilibrium of prooxidative-antioxidative parameters in animals fed PF and MA (decrease in relative generation of  $H_2O_2$ , CD reduced to control levels). Cadmium-induced high lipoperoxidation in the liver of animals fed

a diet with soybean oil (PUFA = 61.2% vs 11.9 and 21.9% in PF and MA, respectively) was only slightly affected by vitamin E (CD significantly higher than in the control group in spite of a significantly higher activity of GSH-Px). No change in the relative generation of  $H_2O_2$  in a SO diet together with other results shown here indicates a synergic effect of several antioxidants.

## REFERENCES

- BOWLES, D. K. - TORGAN, C. E. - EBNER, S. - KAHNER, J. P. - IVY, J. L. - STARNES, J. W.: Effect of acute, submaximal exercise on skeletal muscle vitamin E. Free Rad. Res. Comm., 14, 1991: 139-143.
- CAVAROCCHI, N. C. - ENGLAND, N. D. - O'BRIAN, J. F. - SOLIS, E. - RUSSO, E. et al.: Superoxide generation during cardiopulmonary bypass - is there a role for vitamin E? J. Surg. Res., 40, 1986: 519-527.
- DI MACIO, P. - MURPHY, M. E. - SIES, H.: Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. Amer. J. Clin. Nutr., 53, 1991: 1943S-200S.
- DWYER, J. T.: Health aspect of vegetarian diets. Amer. J. Clin. Nutr., 48, 1988: 712-738.
- FREI, B.: Ascorbic acid protects lipids in human plasma and low-density lipoprotein against oxidative damage. Amer. J. Clin. Nutr., 54, 1991: 1113S-1118S.
- FUZUKAWA, K. - TAKESE, S. - TSUKATANI, M.: The effect of concentration on the antioxidant effectiveness of alpha-tocopherol in lipid peroxidation induced by superoxide free radicals. Arch. Biochem., 240, 1985: 117-120.
- GEY, K. F.: Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. Brit. Med. Bull., 49, 1993: 679-699.
- HALLIWELL, B. - GUTTERIDGE, M. C.: Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. Biochem. J., 219, 1984: 1-14.
- HIMENO, S. - TAKEKAWA, A. - IMURA, N.: Species difference in hydroperoxide-scavenging enzymes with special reference to glutathione peroxidase in guinea pigs. Comp. Biochem. Physiol., 104B, 1993: 27-31.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M.: Age dependence of protein utilization on fat intake of different quality. Veter. Med. (Praha), 35, 1990: 365-372 (in Slovak).
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - BOBEK, P.: Cholesterol concentrations in lipoproteins and different amino acid intake in experiment. Vet. Med. - Czech, 39, 1994: 423-434.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - OZDÍN, L.: Effect of vegetable diet on some values of protein and fat metabolism in rats of different age. Vet. Med. - Czech, 38, 1993: 413-425.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - ŠIMONČIČ, R. - BÉDEROVÁ, A. - ONDREIČKA, R. - KLVANOVÁ, J.: Selected parameters of lipid metabolism in young vegetarians. Ann. Nutr. Metab., 38, 1994a: 331-335.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. - ŠIMONČIČ, R. - BÉDEROVÁ, A. - BABINSKÁ, K. - ONDREIČKA, R.: Selected parameters of lipid metabolism in blood of adult vegetarians. Cor Vasa, 36, 1994b: 237-241.

- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. – ŠIMONČIČ, R. – BABINSKÁ, K. – BÉDEROVÁ, A. – ONDREIČKA, R.: Selected lipid and prooxidative-antioxidative parameters in blood of vegetarians. Bratisl. Lek. Listy, 95, 1994c: 344–348.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. – ŠIMONČIČ, R. – BÉDEROVÁ, A. – BABINSKÁ, K. – ONDREIČKA, R.: Selected prooxidative-antioxidative parameters in blood of adult vegetarians. Oncol. Rep., 2, 1995a: 77–80.
- KRAJČOVIČOVÁ-KUDLÁČKOVÁ, M. – ŠIMONČIČ, R. – BABINSKÁ, K. – BÉDEROVÁ, A. – ONDREIČKA, R. – GRANČIČOVÁ, E.: Essential antioxidant levels in plasma of vegetarians. Cor Vasa, 37, 1995b: (in press).
- MISRA, M. – RODRIQUEZ, R. E. – KASPRZAK, K. S.: Nickel induced lipid peroxidation in the rat: correlation with nickel effect on antioxidant defense systems. Toxicol., 64, 1990: 1–17.
- MURRAY, M.: *In vitro* and *in vivo* studies of the effect of vitamin E on microsomal cytochrome P450 in rat liver. Biochem. Pharm., 42, 1991: 2107–2114.
- NARDINI, M. – SCACCINI, C. – D'AQUINO, M. – BENEDETTI, P. C. – DI FELICE, M. – TOMASSI, G.: Lipid peroxidation in liver microsomes of rats fed soybean, olive, and coconut oil. J. Nutr. Biochem., 4, 1993: 39–44.
- NRC: Nutrient requirement of laboratory animals. Washington, National Academy of Sciences 1978. 77 p.
- PAGLIA, D. E. – VALENTINE, W. N.: Studies on the quantitative and qualitative characterisation of erythrocyte glutathione peroxidase. J. Lab. Clin. Med., 70, 1967: 158–169.
- RECKNAGEL, R. – GLENDE, E. A.: Spectrophotometric detection of lipid conjugated dienes. In: COLOWICK, S. R. – KAPLAN, N. O.: Methods in Enzymology. San Diego, Academic Press 1984: 331–337.
- ROJAS, C. – CADENAS, S. – PÉREZ-CAMPO, R. – LÓPEZ-TORRES, M. – PAMPLONA, R. – PRAT, J. – BARJA, G.: Relationship between lipid peroxidation, fatty acid composition, and ascorbic acid in the liver during carbohydrate and caloric restriction in mice. Arch. Biochem. Biophys., 306, 1993: 59–64.
- SALVATI, S. – MALVEZZI CAMPEGGI, L. – BENEDETTI, P. C. – DI FELICE, M. – GENTILE, V. – NARDINI, M. – TOMASSI, G.: Effect of dietary oils on fatty acid composition and lipid peroxidation of brain membranes (myelin and synaptosomes) in rats. J. Nutr. Biochem., 4, 1993: 346–350.
- SIES, H.: Oxidative stress: oxidants and antioxidants. London, Academic Press 1991.
- STÄHELIN, H. B. – EICHHOLZER, M. – LUDIN, E. – GEY, K. F. – BRUBACHER, G. B.: Cancer mortality and vitamin E status. Ann. NY Acad. Sci., 570, 1989: 391–399.
- SUN, Y.: Free radicals, antioxidant enzyme, and carcinogenesis. Free Rad. Biol. Med., 8, 1990: 583–599.
- TIIDUS, P. M. – BEHRENS, W. A. – MADERE, E. – KIM, J. J. – HOUSTON, M. E.: Effect of vitamin E status and exercise training on tissue lipid peroxidation based on two methods of assessment. Nutr. Res., 13, 1993: 219–224.
- VERANJAN, O. A. – VOLKOVA, N. A. – KARPLUK, I. A.: Effect of cadmium on organism at different protein content of diets. Vopr. Pitan., 58, 1989: 33–37.

Arrived on 3rd April 1995

---

Contact Address:

Ing. Marica Kudláčková, CSc., Výskumný ústav výživy, Limbová 14, 833 37 Bratislava, Slovenská republika  
Tel: 07/37 35 60, fax 07/37 36 18

---

## NEUROSURGICAL TREATMENT OF INTERVERTEBRAL DISC DISEASE IN THE DOG

### NEUROCHIRURGICKÁ LÉČBA ONEMOCNĚNÍ MEZIOBRATLOVÝCH PLOTÉNEK U PSŮ

A. Nečas

*University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Intervertebral disc degeneration and protrusion or extrusion of disc material into the vertebral canal cause focal compressive myelopathy and radiculopathy, the most common neurological syndrome in dogs. Clinical findings are variable depending on duration and location of the lesion, volume of the mass and dynamic considerations (peracute massive extrusion, chronic partial extrusion, chronic progressive extrusion). Aim of this article is to provide compendium of at-the-present-time recommended methods of surgical treatment of intervertebral disc disease in the dog. In the case of compression of spinal cord is performed decompressive surgery (ventral cervical decompression, hemilaminectomy, minihemilaminectomy, dorsal laminectomy and foramenotomy). Fenestration is the only method of prophylaxis.

dog; spinal cord; intervertebral disc; fenestration; hemilaminectomy; dorsal laminectomy; foramenotomy

**ABSTRAKT:** Degenerace meziobratlových plotének a protruze nebo extruze hmot disku do páteřního kanálu je příčinou fokální kompresní myelopatie a radikulopatie, nejčastějšího neurologického syndromu u psů. Klinické projevy se liší v závislosti na délce trvání a lokalizaci léze, objemu vyhřezlých hmot disku a dynamice výhřezu (tj. perakutní masivní extruze, chronická parciální extruze, chronická progresivní protruze). Smyslem tohoto článku je poskytnout přehled v současné době doporučovaných chirurgických metod léčby onemocnění disků u psů v jednotlivých úsecích páteře. Komprese míchy se řeší dekompresními operacemi (ventrální krční dekomprese, hemilaminektomie, minihemilaminektomie, dorzální laminektomie a foraminotomie). Často diskutovaná fenestrace disků není metodou léčebnou, ale profylaktickou.

pes; mícha; meziobratlová ploténka; fenestrace; hemilaminektomie; dorzální laminektomie; foraminotomie

#### ÚVOD

#### KRČNÍ PÁTEŘ

##### Fenestrace krčních disků

Kandidáty pro fenestraci jsou psi s mineralizací, případně protruzí disku, projevující se návratnou bolestivostí krku a svalovými spazmy. Cílem tohoto chirurgického zákroku je prevence možné herniace disků. Rutinně se fenestrují disky v meziobratlových prostorech C2-C3 až C6-C7 (Tombs, 1992). Fenestrace se neprovádí u zvířat s příznaky komprese míchy (kompresní myelopatie). Neurologické komplikace spojené s fenestrací krčních disků vznikají jen zřídka. V úvahu přichází tetraparéza vzniklá sekundárně po iatrogení extruzi hmot disku do páteřního kanálu.

##### Operační technika

Při fenestraci krčních disků se využívá ventrální přístup ke krčním obratlům (Tomlinson a Schwink,

1993). Pacienta v inhalační anestézii umístíme do hřbetní polohy s hrudními končetinami nataženými dozadu podél těla. Krk podložíme tak, aby krční páteř byla v extenzi. Kůži a podkoží incidujeme ve ventrální střední linii v rozsahu od hrтанu po *manubrium sterni*. Tím obnažíme párový *m. sternomastoideus* a *m. sternohyoideus*. Separací těchto svalů v mediální linii obnažíme průdušnici. V preparaci pokračujeme po její pravé straně, přičemž nesmíme porušit *a. carotis* a *n. laryngeus recurrens*. Odtážením průdušnice na levou stranu chráníme jícen a zároveň zpřístupníme párový *m. longus colli*, upínající se na ventrální plochu obratlů. Orientačními body pro identifikaci obratlů a meziobratlových prostorů jsou křídla atlasu a velké příčné výběžky šestého krčního obratle. Meziobratlová ploténka leží vždy těsně kaudálně od *tuberculum ventrale* každého obratle. Tupou preparací obnažíme *ligamentum longitudinale ventrale* a *anulus fibrosus*. Hrotnatým skalpelem vyřízneme ve ventrální části anulu pravouhlé okénko (obr. 1) a srpkem nebo malou ostrou lžičkou vyjmeme co největší množství *nucleus pulposus*.

Jednotlivými stehy vstřebatelným materiálem sešijeme *m. sternohyoideus* a *m. sternomastoideus* a pokračujeme

čovacím stehem podkoží. Kůži šijeme jednotlivými stehy nevstřebatelným materiálem. Stehy vyjímáme za 14 dnů.

### Ventrální krční dekomprese

Indikací pro ventrální dekompresi jsou extrudované masy uvnitř páteřního kanálu, které způsobují kompresi míchy s příznaky tetraparézy až tetraplegie. V případě lateralizované léze se objevují příznaky poškození míšního kořene na jedné hrudní končetině. Rozsáhlá manipulace s míchou během operace může být příčinou fatální zástavy dechu, hypotenze a bradykardie (Toombs, 1992). Proto je při provádění ventrální krční dekomprese nezbytné pečlivé předoperační vyšetření a monitorování srdeční činnosti během operace.

### Operační technika

Poloha pacienta a operační přístup jsou podobné jako při fenestraci krčních disků (Tomlinson a Schwinck, 1993). Po vypalování ventrálních výběžků obratlů tupě odpreparujeme *m. longus colli* od ventrální plochy těla obratle kraniálně a kaudálně od postiženého disku. Kostními kleštěmi odštípeme ventrální výběžek a vysokootáčkovou frézou vyfrézujeme pravouhloú longitudinální drážku v místě meziobratlové ploténky a přilehlé části těl obratlů. Délka drážky by neměla přesáhnout jednu třetinu délky každého z obratlů a její šířka by neměla být větší, než je polovina šířky obratle. Hloubku frézování kontrolujeme podle charakteru kosti. Nejdříve je vidět bílá vrstva vnější kortikalis, poté silnější červenohnědá spongiózní vrstva a nakonec tenká vnitřní vrstva bílé kortikální kosti, která přiléhá k *ligamentum longitudinale dorsale*. Střídavě

laváže a odsávání v průběhu frézování brání spálení kosti a zlepšují přehlednost operačního pole. Krvácení z obnažené spongiózy můžeme zastavit vtláčením malého množství kostního vosku do krvácející kosti (Toombs a Bauer, 1993). K odstranění prvních dvou vrstev kosti se obvykle používá oválná frézka. Tenkou vnitřní vrstvou kosti odstraňujeme pomocí malé kulaté frézky. Zbytky dorzální části *annulus fibrosus* a *ligamentum longitudinale dorsale* je třeba s nejvyšší opatrností odstranit moskytem a hrotnatým skalpelem nebo malými kostními klíšťkami. Je třeba se vyvarovat porušení vertebrálních venózních sinů. Hmotu extrudovaného disku vyjmeme tupým háčkem nebo tupou neurochirurgickou sondou nejprve z centrální a poté z laterální části páteřního kanálu. Správně provedená dekomprese je taková, kdy po vyjmutí hmoty disku a tkáňového detritu přes brázdou zcela jasně vidíme *duru mater*. Po dekompresi je možno fenestrovat zbývající krční disky.

Chronické extruze disků doprovází výskyt zánětlivých reakcí a adhezí na duře a venózních sinech. Odstranění ulpělých mas často způsobí značné krvácení z venózních sinů. Pro zástavu krvácení je obvykle nutné vyplnit brázdou na několik minut tukem a uvolnit tlak na jugulární vény. V době, kdy čekáme než se zastaví krvácení, můžeme fenestrovat okolní disky. Po dokončení dekomprese vyplníme dekompresní brázdou tukovým štěpem, abychom předešli možné kompresi míchy fibrózní tkání, která v průběhu hojení přemostí defekt v kosti. Ránu uzavřeme podobně jako po ventrální fenestraci krčních disků.

### Dorzální krční dekomprese

Laterální nebo intraforaminální extruze disku vyžaduje dekompresi laminektomií, případně hemilami-



1. Excize ventrální části *annulus fibrosus* při fenestraci krčního disku – Excision of ventral part of annulus fibrosus during cervical disc fenestration

nektomií. I když je dorzální přístup (Tomlinson a Schwinck, 1993) technicky náročnější, je jedinou cestou jak se dostat k extrudovanému disku.

#### Operační technika

Psa umístíme do hrudní polohy a krk podložíme tak, aby krční úsek páteře byl ve flexi. Kůži incidujeme v dorzální střední linii v rozsahu od *protuberantia occipitalis* po *processus spinosus* prvního hrudního obratle. Incizí prohloubíme až k *ligamentum nuchae*. Po jedné straně od *ligamentum nuchae* incidujeme dorzální krční svaly až do úrovně trnových výběžků a poté svaly uvolníme od trnových výběžků a oblouků obratlů. Široký vaz s připojenými svaly odtáhneme laterálně. Oblouky obratlů obnažíme laterálním směrem až do úrovně příslušného *processus articularis*. Odstraňujeme-li jen jednu stranu oblouku obratle, jedná se o hemilaminektomii, resekujeme-li celý oblouk, včetně trnového výběžku, mluvíme o dorzální laminektomii. Z nástrojového vybavení je k tomuto účelu nejvhodnější kostní fréza, použít můžeme i Kerrisonovy kostní kleště. Extrudovaný disk vyjme moskytem nebo tupým háčkem. K případné durotomii slouží pravoúhlé kardiovaskulární nůžky.

Součástí uzávěru chirurgické rány je vložení volného tukového štěpu do laminektomického defektu z důvodu prevence tvorby jizvovité tkáně. Dorzální krční svaly přišijeme k mediálnímu vazivovému septu a k *ligamentum nuchae*, pak sešijeme podkožní fascii, podkoží a kůži.

## TORAKOLUMBÁLNÍ PÁTEŘ

### Dorzolaterální fenestrace torakolumbálních disků

Pacienty vhodnými pro tento operační zákrok jsou psi s návratnou bolestivostí v torakolumbálním úseku páteře a psi s mírnou ataxií, kteří neodpovídají na léčbu konzervativní. Při rtg vyšetření se zjistí kalcifikovaný disk (disky) bez kompresní léze uvnitř páteřního kanálu. Fenestrací se může předejít budoucí možné herniaci disku. Při fenestraci disků v rozsahu od T10–T11 po L4–L5 je možné zvolit přístup separace dorzolaterálních svalů (Tomlinson a Schwinck, 1993). Výhodou tohoto přístupu, oproti přístupu dorzálnímu, je zkrácení doby operace a omezení traumatizace tkáně (Walker a Betts, 1985). Ke komplikacím dochází jen zřídka. Patří mezi ně pneumotorax (během fenestrace hrudních disků) a paralýza ventrálních břišních svalů (způsobená poškozením míšního nervu).

#### Operační technika

Psa umístíme do břišní polohy a kůži incidujeme těsně laterálně od střední linie v rozsahu od středu hrudníku po lumbosakrální spojení. Podkoží a tuk odpreparujeme laterálně, a tím obnažíme v kaudální části incize

hlubokou vnější povázku trupu a v kranialní části incize *m. spinalis et semispinalis*. Hlubokou povázku protne ve vzdálenosti půl až jednoho centimetru laterálně od střední linie, paralelně s trnovými výběžky lumbálních obratlů, a poté incizí v jejím kranialním konci v oblasti *m. spinalis et semispinalis* vedeme blíže k mediální linii. Oddělíme *m. multifidus* (mediálně) a *m. longissimus* (laterálně), čímž obnažíme slachy *m. longissimus*, upínající se na *processus accessorii* obratlů. Raspatoriem nebo moskyto-peanem jemně odtáhneme svaly, povázku a míšní nerv tak, že obnažíme prostor disku, který je vždy ventrálně od úponu *m. longissimus*. Abychom nepoškodili míšní nerv a cévy, odtáhneme je neurologickým háčkem kranialně. Hrotinatým skalpelem vyřízneme do anulu okénko a malou ostrou lžičkou nebo zahnutým srpkem vybavíme nukleus.

Uzávěr operační rány spočívá v sešití okrajů povázký jednotlivými stehy vstřebatelným materiálem a v rutinní sutuře podkoží a kůže.

### Ventrální fenestrace torakolumbálních disků

Tento způsob fenestrace vyžaduje torakotomii v 10. mezižebním prostoru v kombinaci s parakostální laparotomií. Pro komplikace spojené s torakotomií a retroperitoneální preparací tento přístup na našem pracovišti nepoužíváme.

### Hemilaminektomie

Hemilaminektomie představuje jednostranné odstranění oblouku obratle. Je indikována u psů s kompresní myelopatií a radikulopatií, projevující se perzistentní torakolumbální bolestivostí, parézou nebo paralýzou pánevních končetin a abnormální funkcí močového ústrojí. Výhodou této operační techniky, ve srovnání s dorzální laminektomií, je menší traumatizace tkáně, menší pravděpodobnost tvorby jizvy v místě dekomprese, zachování dostatečné biomechanické stability obratlů, lepší přístupnost pro současnou fenestraci disků (McKee, 1992) a možnost šetrného odstranění ventrálně nebo ventrolaterálně od míchy extrudovaných hmot disku.

#### Operační technika

Pacienta uložíme do hrudní polohy. Knecht (1987) nedoporučuje podkládat břicho polštáři, protože se tím omezí návrat venózní krve přes v. *cava caudalis*, zvýší se průtok krve přes vertebrální venózní plexus a tím i krvácení v operačním poli. Kůži incidujeme těsně laterálně od dorzální střední linie. Incize by měla zasahovat 5–10 cm kranialně a kaudálně od postiženého meziobratlového prostoru. Protne podkoží až k *ligamentum supraspinatum* a hluboké povázce. Kolem trnových výběžků incidujeme *ligamentum supraspinatum*. Raspatoriem uvolníme na jedné straně od trnových výběžků a od oblouků obratlů *m. multifidus lumborum*, a to laterálně až k *processus accessorius*. Opatrně, abychom se vyhnuli krvácení, odpreparujeme svalové apo-

neurózy na každém processus mammillaris a processus accessorius. Jakmile svaly uvolníme z jejich úponů na kosti, rozevřeme je pomocí autofixů. Místo postžení, identifikované na nativním rtg snímku – myelogramu (Barber aj., 1987), musíme přesně lokalizovat i během operace. Orientačním bodem pro vyhledání správného meziobratlového prostoru je 13. (nebo poslední) žebro.

Jakmile identifikujeme daný meziobratlový prostor, odštípeme kostními kleštěmi příslušný *processus articularis*. Opatrně odřezujeme kortikální kost a spongiózu z laterální části laminy (obr. 2), a to v rozsahu od místa, kde se napojuje na tělo obratle a dorzálně až k bázi *processus spinosus*, kranialně a kaudálně až k bázi *processus articularis*, před a za místem hemilaminektomie. Vnitřní kortikalis odštípeme malými kostními kleštěmi. Je-li to nezbytné, můžeme otvor prodloužit přes tři meziobratlové prostory. U malých psů lze celou hemilaminektomii provést pouze kostními kleštěmi (Swaim, 1987). Je třeba zvláštní opatrnosti, abychom se vyvarovali jakéhokoli kontaktu kleští nebo hrotu frézky s míchou. Další trauma, již i tak poškozené míchy, může způsobit prodloužení doby rekonvalescence nebo může dokonce navodit trvalé neurologické deficity. K dodržení atraumatické chirurgické techniky přispívá pečlivá hemostáze.

Extrudované hmoty disku (obr. 3) vyjme z páteřního kanálu tupým neurologickým háčkem tak, abychom nepoškodili míšní kořeny a vertebrální siny. Drobné částičky vyhřezlého disku můžeme jemně vypláchnout fyziologickým roztokem. Pro zlepšení prognózy u pacientů s dubiózní hlubokou bolestivostí můžeme provést durotomii. Po dokončení dekomprese míchy (obr. 4) překryjeme hemilaminektomický defekt tukovým štěpem, abychom zabránili vzniku adhezi.

Jednotlivými stehy vstřebatelným materiálem sešijeme torakolumbální fascii v místě dorzální střední linie. Rutinním způsobem uzavřeme podkoží a kůži.

## Minihemilaminektomie

Je modifikací klasické hemilaminektomie. Spočívá v odstranění laterální části laminy v místě *foramen intervertebrale*. *Processus articulares* zůstávají nedotčeny, proto pooperační instabilita obratlů je minimální (Jeffery, 1988). Minihemilaminektomie je vhodná v případech stranových extruzí a snadněji se provádí u malých plemen psů (Wheeler a Sharp, 1994)

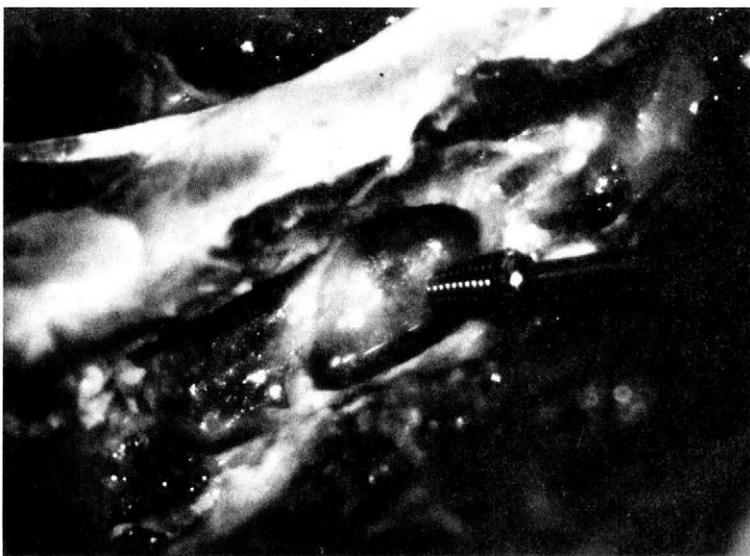
## Dorzální laminektomie

Laminektomie je v úseku torakolumbálním chirurgickou metodou volby otevření páteřního kanálu. Představuje odstranění dorzálních trnových výběžků, dorzální laminy a v různém rozsahu i *processus articulares* a pedikulů přinejmenším dvou za sebou ležících obratlů.

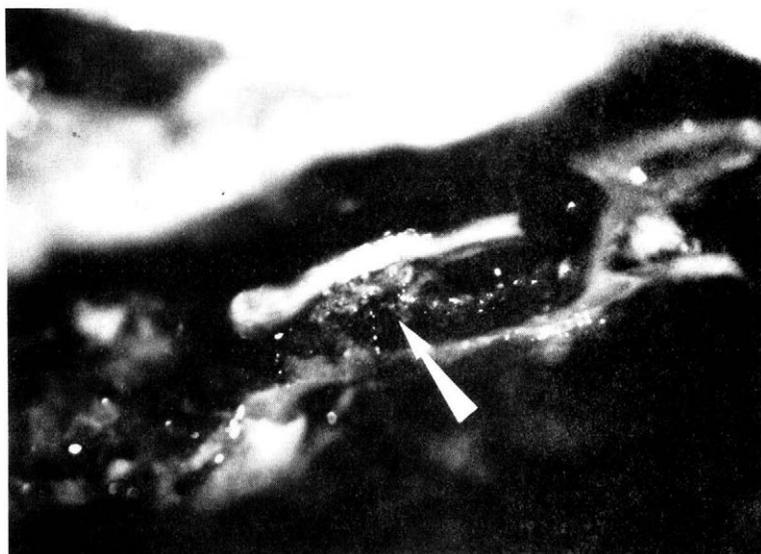
Laminektomie typu A podle Funkquistové (cit. Hoerlein, 1971) spočívá v odstranění jak kranialního, tak kaudálního *processus articularis* a v částečném odstranění pedikulů. Ačkoli poskytují snadné obnažení míchy, je podle Funkquistové nejvíce náchylná na vznik konstriční fibrózy.

Při typu B laminektomie podle Funkquistové (cit. Hoerlein, 1971) se zachovávají celé *processus articulares craniales*, větší část kaudálních kloubních výběžků a pedikulů. Při této úzké laminektomii není problémem konstriční fibróza, ale přístup do páteřního kanálu je omezený. Pokusy o odstranění ventrálně nebo ventrolaterálně ležících kompresních mas tímto omezeným přístupem mohou vést k iatrogenímu poškození míchy.

V případech modifikované dorzální laminektomie (Trotter, 1990) se odstraňuje *processus articularis caudalis*, ale ponechává se intaktní větší část každého *processus articularis cranialis*. Odfrézováním mediálních ploch pedikulů lze dosáhnout lepšího obnažení páteř-



2. Hemilaminektomie: odstranění vnější kortikalis a spongiózy kostní frézou – Hemilaminektomy: removal of outer cortical layer and cancellous bone with a drill and bur



3. Komprese míchy způsobená extrudovaným diskem (šipka) – The spinal cord compression caused by extruded disc (arrow)



4. Mícha po dekompresi a vyjmutí hmot disku – The spinal cord after decompression and mass removal

ního kanálu, než u laminectomie typu B bez zvýšeného rizika pooperační konstriční fibrózy.

Žádná z popsaných technik dorzální laminectomie neumožňuje přímý přístup k ventrální ploše páteřního kanálu. Ve většině případů je přítom tento přístup základem předpokladem úspěchu operace. Z toho důvodu dáváme v torakolumbálním úseku páteře přednost hemilaminectomií.

#### LUMBOSAKRÁLNÍ SPOJENÍ

Extruze (protruze) disku v meziobratlovém prostoru L7-S1 může být jednou z příčin syndromu *cauda equi-*

*na*. V tomto úseku páteře se k dekompresi používá dorzální laminectomie, která se v případě komprese v místě meziobratlového otvoru doplňuje foraminotomií (rozšíření *foramen intervertebrale*).

#### LITERATURA

- BARBER, D. L. – OLIVER, J. E. – MAYHEW, I. G.: Neuroradiography. In: OLIVER, J. E. – HOERLEIN, B. F. – MAYHEW, I. G.: Veterinary neurology. Philadelphia, W. B. Saunders 1987.
- HOERLEIN, B. F.: Intervertebral disks. In: HOERLEIN, B. F.: Canine neurology. Philadelphia, W. B. Saunders 1971.

- JEFFERY, N. D.: Treatment of acute and chronic thoracolumbar disc disease by „mini hemilaminectomy“. *J. Small Anim. Pract.*, 29, 1988: 611–615.
- KNECHT, C. D.: Principles of neurosurgery. In: OLIVER J. E. – HOERLEIN, B. F. – MAYHEW, I. G.: *Veterinary neurology*. Philadelphia, W. B. Saunders 1987.
- McKEE, W. M.: A comparison of hemilaminectomy (with concomitant disc fenestration) and dorsal laminectomy for the treatment of thoracolumbar disc protrusion in dogs. *Vet. Rec.*, 130, 1992: 296–300.
- SWAIM, S. F.: Vertebral and spinal cord surgery. In: OLIVER, J. E. – HOERLEIN, B. F. – MAYHEW, I. G.: *Veterinary neurology*. Philadelphia, W. B. Saunders 1987.
- TOMLINSON, J. – SCHWINK, K. L.: Surgical approaches to the spine. In: SLATTER, D. H.: *Textbook of small animal surgery*. Vol. 1. Philadelphia, W. B. Saunders 1993.
- TOOMBS, J. P.: Cervical intervertebral disk disease in dogs. *Continuing education*, 14, 1992: 1477–1489.
- TOOMBS, J. P. – BAUER, M. S.: Intervertebral disk disease. In: SLATTER, D. H.: *Textbook of small animal surgery*, Vol. 1. Philadelphia, W. B. Saunders 1993.
- TROTTER, E. J.: Dorsal laminectomy for treatment of thoracolumbar disc disease. In: BOJRAB, M. J.: *Current techniques in small animal surgery*. Philadelphia, Lea and Febiger 1990.
- WALKER, T. L. – BETTS, C. W.: Intervertebral disc disease. In: SLATTER, D. H.: *Textbook of small animal surgery*, Vol. 1. Philadelphia, W. B. Saunders 1985.
- WHEELER, S. J. – SHARP, N. H. J.: *Small animal spinal disorders – diagnosis and surgery*. London, Mosby 1994.

Došlo 13. 2. 1995

---

*Kontaktní adresa:*

MVDr. Alois Nečas, Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno, Česká republika, Tel. 05/41 32 11 07, fax 05/41 21 11 51 ☎

---

## POKYNY PRO AUTORY

Časopis uveřejňuje původní vědecké práce, krátká sdělení a výběrově i přehledné referáty, tzn. práce, jejichž podkladem je studium literatury a které shrnují nejnovější poznatky v dané oblasti. Práce jsou uveřejňovány v češtině, slovenštině nebo angličtině. Rukopisy musí být doplněny krátkým a rozšířeným souhrnem. Časopis zveřejňuje i názory, postřehy a připomínky čtenářů ve formě kurzív, glosy, dopisu redakci, diskusního příspěvku, kritiky zásadního článku apod., ale i zkušenosti z cest do zahraničí, z porad a konferencí.

Autoři jsou plně odpovědní za původnost práce a za její věcnou i formální správnost. K práci musí být přiloženo prohlášení o tom, že práce nebyla publikována jinde.

O uveřejnění práce rozhoduje redakční rada časopisu, a to se zřetel k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce impromvado u vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI (ČSN 01 1300).

**Vlastní úprava** práce rukopisu má odpovídat státní normě ČSN 88 0220 (formát A4, 30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s prací pořízenou na PC v některém textovém editoru, nejlépe v T602. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

Pokud autor používá v práci zkratky jakéhokoliv druhu, je nutné, aby byly alespoň jednou vysvětleny (vypsány), aby se předešlo omylům. V názvu práce a v souhrnu je vhodné zkratky nepoužívat.

**Název práce** (titul) nemá přesáhnout 85 úhozů a musí dát přesnou představu o obsahu práce. Jsou vyloučeny podtitulky článků.

**Krátký souhrn (Abstrakt)** musí vyjádřit všechno podstatné, co je obsaženo v práci, a má obsahovat základní číselné údaje včetně statistických hodnot. Nemá překročit rozsah 170 slov. Je třeba, aby byl napsán celými větami, nikoliv heslovitě.

**Rozšířený souhrn** prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu cca 1–2 strojopisných stran komentovány výsledky práce a uvedeny odkazy na tabulky a obrázky, popř. na nejdůležitější literární citace. Je vhodné je (včetně názvu práce a klíčových slov) dodat v angličtině, popř. v češtině či slovenštině jako podklad pro překlad do angličtiny.

**Literární přehled** má být krátký, je třeba uvádět pouze citace mající úzký vztah k problému. Tato úvodní část přináší také informaci, proč byla práce provedena.

**Metoda** se popisuje pouze tehdy, je-li původní, jinak postačuje citovat autora metody a uvádět jen případné odchylky. Ve stejné kapitole se popisuje také pokusný materiál a způsob hodnocení výsledků.

**Výsledky** tvoří hlavní část práce a při jejich popisu se k vyjádření kvantitativních hodnot dává přednost grafům před tabulkami. V tabulkách je třeba shrnout statistické hodnocení naměřených hodnot. Tato část by neměla obsahovat teoretické závěry ani dedukce, ale pouze faktické nálezy.

**Diskuse** obsahuje zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu spolu s výsledky.

**Literatura** musí odpovídat státní normě ČSN 01 0197. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů. Odkazy na literaturu v textu uvádějí jméno autora a rok vydání. Do seznamu se zařadí jen práce citované v textu. Na práce v seznamu literatury musí být odkaz v textu.

**Klíčová slova** mají umožnit vyhledání práce podle sledovaných druhů zvířat, charakteristik jejich zdravotního stavu, podmínek jejich chovu, látek použitých k jejich ovlivnění apod. Jako klíčová slova není vhodné používat termíny uvedené v nadpisu práce.

Na zvláštním listě uvádí autor plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

## INSTRUCTIONS FOR AUTHORS

Original scientific papers, short communications, and selectively reviews, that means papers based on the study of technical literature and reviewing recent knowledge in the given field, are published in this journal. Published papers are in Czech, Slovak or English. Each manuscript must contain a short or a longer summary. The journal also publishes readers' views, remarks and comments in form of a text in italics, gloss, letter to the editor, short contribution, review of a major article, etc., and also experience of stays in foreign countries, meetings and conferences.

The authors are fully responsible for the originality of their papers, for its subject and formal correctness. The authors shall make a written declaration that their papers have not been published in any other information source.

The board of editors of this journal will decide on paper publication, with respect to expert opinions, scientific importance, contribution and quality of the paper. The editors accept papers approved to print by the head of the workplace or persons with all the authors' statement they approve it to print.

The extent of original papers shall not exceed ten typescript pages, including tables, figures and graphs.

**Manuscript layout** shall correspond to the State Standard ČSN 88 0220 (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette should be provided with the paper, written in an editor program, preferably T602. Tables, figures and photos shall be enclosed separately. The text must contain references to all these annexes.

The **title** of the paper shall not exceed 85 strokes and it should provide a clear-cut idea of the paper subject. Subtitles of the papers are not allowed either.

**Abstract.** It must present information selection of the contents and conclusions of the paper, it is not a mere description of the paper. It must present all substantial information contained in the paper. It shall not exceed 170 words. It shall be written in full sentences, not in form of keynotes and comprise base numerical data including statistical data.

**Introduction** has to present the main reasons why the study was conducted, and the circumstances of the studied problems should be described in a very brief form. This introductory section also provides information why the study has been undertaken.

**Review of literature** should be a short section, containing only literary citations with close relation to the treated problem.

Only original method shall be described, in other cases it is sufficient enough to cite the author of the used method and to mention modifications of this method. This section shall also contain a description of experimental material and the method of result evaluation.

In the section **Results**, which is the core of the paper, figures and graphs should be used rather than tables for presentation of quantitative values. A statistical analysis of recorded values should be summarized in tables. This section should not contain either theoretical conclusions or deductions, but only factual data should be presented here.

**Discussion** contains an evaluation of the study, potential shortcomings are discussed, and the results of the study are confronted with previously published results (only those authors whose studies are in closer relation with the published paper should be cited). The sections Results and Discussion may be presented as one section only.

The citations are arranged alphabetically according to the surname of the first author. References in the text to these citations comprise the author's name and year of publication. Only the papers cited in the text of the study shall be included in the list of references. All citations shall be referred to in the text of the paper.

**Key words** should make it possible to retrieve the paper on the basis of the animal species investigated, characteristics of their health, husbandry conditions, applied substances, etc. The terms used in the paper title should not be used as keywords.

If any abbreviation is used in the paper, it is necessary to mention its full form at least once to avoid misunderstanding. The abbreviations should not be used in the title of the paper nor in the summary.

The author shall give his full name (and the names of other collaborators), academic, scientific and pedagogic titles, full address of his workplace and postal code, telephone and fax number, or E-mail.

### CONTENTS

Kummer V., Zralý Z., Čanderle J., Mašková J.: Light and scanning electron microscopy of endometrium of ovariectomized cows treated with oestradiol.....	265
Raszyk J., Pokorná Z., Strnadová V., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Salava J., Palác J.: Mutagenicity of stable dust and drinking water on swine and cattle farms.....	265
Veselý D., Veselá D.: Embryotoxic effects of the combination of zearalenone and vomitoxin (4-deoxynivalenol) on chick embryo.....	279
Mihelić, D., Zobunđija M., Brkić A., Gjurčević-Kantura V., Slavica A., Bačić G., Matolek Z., Brozović S.: Anatomical possibilities of access to and blockade of <i>n. femoralis</i> in the dog	283
Juriš P., Világiová I., Plachý P.: Importance of flies ( <i>Diptera – Brachycera</i> ) in the distribution of helminth eggs from municipal sewage treatment plants.....	289
Krajčovičová-Kudláčková M., Ozdín L.: Effect of fatty acid composition, cadmium and vitamin E intake on prooxidative-antioxidative state of rat liver.....	293
REVIEW	
Nečas A.: Neurosurgical treatment of intervertebral disc disease in the dog.....	299

## VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 40, č. 9, Září 1995

### OBSAH

Kummer V., Zralý Z., Čanderle J., Mašková J.: Světelná a rastrovací elektronová mikroskopie endometria ovariektomovaných krav po aplikaci estradiolu.....	265
Raszyk J., Pokorná Z., Strnadová V., Gajdůšková V., Ulrich R., Jarošová A., Salava J., Palác J.: Mutagenní aktivita stájového prachu a napájecí vody v chovech prasat a skotu.....	273
Veselý D., Veselá D.: Emryotoxický účinek kombinace zearalenonu a vomitoxinu (4-deoxy-nivalenolu) na kuřeček zárodek.....	279
Mihelić, D., Zobunđija M., Brkić A., Gjurčević-Kantura V., Slavica A., Bačić G., Matolek Z., Brozović S.: Možnosti přístupu a následná blokáda <i>n. femoralis</i> u psa.....	283
Juriš P., Világiová I., Plachý P.: Význam mých ( <i>Diptera – Brachycera</i> ) při šíření vajčích helmintů z čistírenských kalů.....	289
Krajčovičová-Kudláčková M., Ozdín L.: Vplyv zloženia mastných kyselín, príjmu kadmia a vitamínu E na proxiadačno-antioxidačný stav pečene potkanov.....	293
PŘEHLEDY	
Nečas A.: Neurochirurgická léčba onemocnění meziobratlových plotének u psů.....	299