

ÚZPI

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

11

VOLUME 42 (LXIX)
PRAHA
NOVEMBER 1997
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gestí České akademie zemědělských věd

An international journal published under the authorization by the Ministry of Agriculture and under the direction of the Czech Academy of Agricultural Sciences

Editorial Board – Redakční rada

Chairman – Předseda

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

Members – Členové

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

Arnost Cepica, DVM., Ph.D., Associate Professor (Virology/Immunology), Atlantic Veterinary College, U.P.E.I., Charlottetown, Canada

Dr. Milan Fránek, DrSc., Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

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

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

Prof. MUDr. Drahomír Horký, DrSc., Faculty of Medicine, Masaryk University, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. RNDr. Petr Hořík, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Doc. MVDr. František Kovářů, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, Ph.D., DSc. (h. c.), National Institute for Biological Standards and Control, United Kingdom

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

Prof. RNDr. Václav Suchý, DrSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, 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 Veterinární medicína uveřejňuje původní vědecké práce a studie typu review ze všech oblastí veterinární medicíny 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 42 vychází v roce 1997.

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.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: fofo@uzpi.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1997 je 564 Kč.

Aims and scope: The journal Veterinární medicína original publishes papers and reviews from all fields of veterinary medicine 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 42 appearing in 1997.

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.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38, e-mail: fofo@uzpi.cz. Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

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 1997 is 132 USD (Europe), 138 USD (overseas).

EFFECT OF SALINE DRINKING WATER ON LAYING HEN PRODUCTIVITY

VPLYV SLANEJ VODY NA ÚŽITKOVOSTĚ NOSNÍC

A. Hadžiosmanović¹, M. Vučemilo¹, J. Venglovský²

¹ *Department of Animal Hygiene, Environment and Ethology, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Republic of Croatia*

² *Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic*

ABSTRACT: Studies were conducted on two farms for housing of Isa Brown hybrid hens, matched by microclimatic parameters and layer mash. Different quality of drinking water was the only variable which may have influenced the health and productivity of hens. Organoleptic, physicochemical and bacteriological parameters of drinking water were compared between a control farm supplied with appropriate town water and experimental farm supplied with inappropriate underground water. Electrical conductivity ($3\ 037 \pm 1\ 714\ \mu\text{S}/\text{cm}$), and the concentration of chloride ($612.8 \pm 152.2\ \text{mg}/\text{l}$) and sodium ($466.3 \pm 115.6\ \text{mg}/\text{l}$) were significantly increased in the water supplied to the experimental group as compared to the control group of hens, indicating the former to be saline water. Other organoleptic, physicochemical and bacteriological parameters also exceeded the allowed limits. Productivity indicators, such as egg production (%), eggshell weight (g), eggshell thickness (μm) and eggshell defects (%) were poorer in the experimental group, which could have been ascribed to the use of saline drinking water. However, statistical analysis revealed no statistically significant differences in egg and shell weight, and shell thickness ($p > 0.05$).

laying hens; saline drinking water; eggshell quality

ABSTRAKT: Predmetom štúdia boli dve farmy pre chov nosníc, Isa Brown hybrid, s rovnakými mikroklimatickými podmienkami a krmivom pre nosnice. Odlišná kvalita pitnej vody bola jediným parametrom, ktorý mohol ovplyvniť zdravotný stav a úžitkovosť nosníc. Organoleptické, fyzikálno-chemické a bakteriologické hodnoty pitnej vody boli porovnané pre kontrolnú farmu zásobovanú z príslušného mestského zdroja a experimentálnu farmu zásobovanú nevhodnou podzemnou vodou. Elektrická vodivosť ($3\ 037 \pm 1\ 714\ \mu\text{S}/\text{cm}$) a koncentrácia chloridov ($612.8 \pm 152.2\ \text{mg}/\text{l}$) a sodíka ($466.3 \pm 115.6\ \text{mg}/\text{l}$) boli významne zvýšené vo vode, ktorou bola zásobovaná pokusná skupina v porovnaní s kontrolnou skupinou zvierat, čo naznačovalo, že v prvom prípade išlo o slanú vodu. Iné organoleptické, fyzikálno-chemické a bakteriologické parametre tiež prekročovali prípustné hodnoty. Ukazovatele úžitkovosti, ako je znáška (%), hmotnosť vaječnej škrupiny (g), jej hrúbka ($\pm\text{m}$) a defekty vaječnej škrupiny (%), boli horšie v experimentálnej skupine, čo sa mohlo pripísať prijímaniu slanej pitnej vody. Štatisticky však neboli zistené významné rozdiely v hmotnosti vajec, vaječnej škrupiny a jej hrúbky ($p > 0.05$).

nosnice; slaná pitná voda; kvalita škrupiny

INTRODUCTION

As an important nutritional component, the water for drinking and watering must meet the requirements concerning organoleptic, physicochemical and bacteriological parameters (Anonymous, 1993, 1994). A reduced quality of watering supply greatly influences the health and growth of animals, their productivity, and feed consumption and utilization. If watering supplies contain excessive concentrations of dissolved salts, additional disturbances in the metabolism of water and minerals, distribution of body fluids, kidney function and blood profile occur (Fayez and Alnaimy, 1994).

Many studies have pointed to an adverse effect of saline drinking water when used in laying hens. These

are mostly underground waters rich in dissolved salts, such as chlorides, sulphates, carbonates and nitrates. The use of such water affects directly the eggshell quality and defects, but not the egg production and weight, or feed utilization. Sensitivity to such a water also depends on the hen strain, and increases with age, thus the percentage of damaged eggs increases toward the end of the laying period.

The NaCl concentration in water has been shown to play a very important role in the phenomena mentioned above. Balnave and Zhang (1992) have found the consumption of saline drinking water to increase the proportion of defective eggshells, regardless of feed and water consumption, egg weight and production. In a study of Balnave et al. (1991), control laying hens

were supplied with town drinking water, whereas control birds received the same water with the addition of NaCl, 2 g/l. A two-fold number of eggshell defects, significantly higher embryonic mortality and significantly lower hatchability were recorded in the experimental group of hens.

The aim of the present study was to assess the effect of saline drinking water on laying hen productivity in practice.

MATERIAL AND METHODS

Farms

Laying hens were housed in typical facilities with about 10 000 Isa Brown hybrid birds. The control and experimental houses were about 8 km apart. Each house contained three four-level battery cages, four hens per cage. Each cage was supplied with two drinking nipples, whereas feed was supplied by a travelling hopper. Eggs were collected manually.

The house was provided with mechanical ventilation and artificial illumination.

Microclimate

Microclimatic parameters such as temperature (°C), relative humidity (%), air velocity (m/s) and mean radiation temperature (°C), important for the housing of laying hens, were monthly determined. The measurements were performed by a Testo 610 thermohygrometer, illumination by a Testo 0500 luxmeter, whereas air gaseous pollution, i.e. CO₂ and NH₃ contents, was determined by a Drger-acuro gas detector pump.

Water

Drinking water supplied to hens in control and experimental facilities originated from different sources. The control hens were supplied with conditioned and disinfected town water, whereas the experimental hens were supplied from a 60 m deep artesian well. The water was pumped into plastic reservoirs fitted below the ceiling, from where it was conveyed to the drinking nipples. Sampling was performed on a monthly basis, from May 1995 through April 1996 ($n = 12$).

On each occasion, physicochemical and bacteriological parameters were analyzed in accordance with standard APHA methods (1975), using titration and photometric procedures on a HACH Drel 2000 chemistry/apparatus modul and HACH conductivity/TDS meter.

The following physical and chemical parameters were analyzed: temperature (°C), pH, color (mg/l Pt Co), electric conductivity (μS/cm), ammonium NH₄-N, nitrite NO₂-N, nitrate NO₃-N, COD-Mn, chloride (mg/l) and total hardness (°dH).

Bacteriological tests included aerobic mesophilic bacteria expressed as colony forming units (cfu/ml) and

total coliform bacteria expressed as most probable number index per 100 ml.

Sodium, potassium, calcium, magnesium and iron (mg/l) in the samples were determined on a Perkin Elmer 1100 B atomic absorption spectrophotometer.

Results were compared with the Croatian guideline values and WHO recommended values.

Experimental parameters

Egg weight and eggshell weight were measured by weighing on an Exacta 200 EB balance to two decimal places. Eggshell thickness (m) was measured using a Precision Plastic Measuring Instrument Manostat 0.1 mm micrometer ($n = 300$). Statgraphics software Ver. 6.0 was used for statistical analysis of parameters of egg and shell weight, and shell thickness. Data on all other productivity parameters were obtained on the farm.

RESULTS

Microclimatic parameters determined in the houses for housing of laying hens throughout the production cycle were found to range within the standard values, so their effect on any of the production parameters appeared to be quite unlikely. Light regime included 16 hours of white light per day, at an intensity of 10–15 lux (Tab. I).

Physical parameters examined by systematic control of drinking water showed a several-fold increase in colour and electric conductivity, as well as in bacteriological parameters of aerobic mesophilic bacteria and total coliform bacteria in the drinking water supplied to the experimental group of birds (Tab. II).

Chemical parameters COD-Mn, ammonium, nitrites and nitrates exceeded the drinking water standard limits of the water supplied to the experimental group, with the most pronounced difference in the concentration of chlorides, which was several times increased (Tab. III). The guideline value for COD-Mn is 3.0 mg/l, ammonium 0.1 mg/l, nitrites 0.03 mg/l, and nitrates 10 mg/l. The recommended value for chlorides is 25 mg/l.

Concentrations of potassium, calcium, magnesium and iron in drinking water supplied to the control and experimental group ranged within the recommended limits, but the concentration of sodium in the drinking water supplied to the experimental group was several dozen-fold than that supplied to the control group (Tab. IV).

Productivity parameters, such as mortality, egg production, shell weight, shell thickness and shell defects, which may have been affected by the quality of drinking water, showed lower or poorer values in the experimental than in the control group.

Statistical analysis using a Statgraphic program showed that there was no statistically significant difference in the parameters of egg and shell weight, and shell thickness ($p > 0.05$).

I. Microclimatic parameters during the production cycle

Parameter	Control house	Experimental house
Air temperature (°C)	20.1 ± 7.2	19.5 ± 6.9
Relative humidity (%)	60.2 ± 5.2	63.5 ± 4.9
Air velocity (m/s)	0.30 ± 0.03	0.32 ± 0.02
Mean temperature of black body radiation (°C)	19.8 ± 7.1	20.5 ± 6.8
CO ₂ (vol. %)	0.20 ± 0.05	0.20 ± 0.05
NH ₃ (ppm)	10 ± 2	10 ± 2
Light intensity (lux)	10–15	10–15

II. Physical and bacteriological parameters determined in drinking water supplied to control and experimental group (mean ± SD; n = 12)

Parameter	Group	
	Control	Experimental
Color (mg/l Pt Co)	2 ± 2	57 ± 3
Temperature (°C)	15.4 ± 1.2	18.1 ± 1.0
pH	7.2 ± 0.2	7.8 ± 0.4
Electric conductivity (µS/cm)	730 ± 165	3 037 ± 1 714
Mesophilic bacteria (cfu/ml)	11	204
Coliform bacteria (MPN/100 ml)	<2	169

III. Chemical parameters determined in drinking water supplied to control and experimental group (mean ± SD; n = 12)

Parameter	Group	
	Control	Experimental
COD – Mn (mg O ₂ /l)	2.55 ± 0.37	11.55 ± 3.59
Ammonium NH ₄ -N (mg/l)	0.04 ± 0.02	1.43 ± 0.45
Nitrite NO ₂ – N (mg/l)	0.004 ± 0.003	0.014 ± 0.029
Nitrate NO ₃ – N (mg/l)	0.7 ± 0.5	11.6 ± 1.2
Chloride Cl ⁻ (mg/l)	31.7 ± 6.5	612.8 ± 152.2
Hardness (°dH)	16.3 ± 1.7	10.1 ± 2.3

IV. Metals in drinking water supplied to control and experimental group (mean ± SD; n = 12)

Metal (mg/l)	Group	
	Control	Experimental
Sodium	15.8 ± 3.8	466.3 ± 115.6
Potassium	2.00 ± 0.55	3.80 ± 2.33
Calcium	72.16 ± 15.00	33.8 ± 9.68
Magnesium	18.9 ± 4.0	17.2 ± 4.0
Iron	0.083 ± 0.02	0.138 ± 0.09

DISCUSSION

Drinking water and watering supplies containing more than 1,000 ppm of total dissolved salts are considered saline waters. Consumption of such saline waters has a detrimental effect on animal health, which increases with salt concentration (Fayez and Alnaimy, 1994).

A number of authors described the adverse effect of saline drinking water, especially of water with high

NaCl concentrations, on laying hens, manifested in the quality of eggshell. Thus, Balnave and Yoselewitz (1987) and Balnave (1993) reported that 0.25 and 0.6 g of NaCl per liter of drinking water resulted in a two- and three-fold increase in the number of eggshell defects, respectively.

Eggshell defects, manifested as cracked or soft eggshells and broken eggs due to saline water consumption, have been related to a decreased concentration of calcium and bicarbonate ions in the shell gland lumen. This has been related to a diminished activity of the enzyme carbonic anhydrase in the shell gland mucosa, which has been ascribed to the inhibitory action of chloride ions upon the enzyme activity (Yoselewitz and Balnave, 1989).

Experiments with various feed supplements carried out to reduce the effect of saline water on eggshell quality were described by Møreng et al. (1992). They added Zn methionine and Zn sulfate to commercial layer mash, and NaCl to drinking water and found the Zn methionine supplementation to improve considerably the shell breaking strength, shell weight and decrease percentage of shell defects. No such improvements were observed for the Zn sulphate supplementation. Similar results were reported by Harbaugh and Sanford (1970).

The addition of ascorbic acid to layer mash and water (Balnave et al., 1991; Balnave and Zhang, 1992) prevents the occurrence of eggshell quality reduction due to saline water, depending on the ascorbic acid concentration.

The present study investigated the effect of drinking water quality on the productivity of laying hens, as determined by the number and weight of eggs and the

Parameter	Group	
	Control	Experimental
Number of laying hens	8 694	9 986
Food intake (g/day)	144.28	132.6
Mortality (%)	4.8	5.2
Egg production (%)	81	78
Egg weight (g), <i>n</i> = 300	65.18 ± 3.62	67.05 ± 5.58*
Shell weight (g), <i>n</i> = 300	6.65 ± 0.56	6.46 ± 0.75*
Shell thickness (µm), <i>n</i> = 300	425 ± 44	377 ± 72*
Shell defects (%)	5.1	10.3

* (*p* > 0.05)

quality of eggshells. The Isa Brown laying hens were kept under the same housing and microclimatic conditions (Tab. I), fed the same layer mash and were supplied with water of different quality. During the study, attention was paid to the layer mash preparation, especially to the NaCl concentration added, which did not exceed the recommended level of 0.35% (Božičković et al., 1974).

The 52-week, i.e. the productivity cycle results, expressed as egg production, egg weight, shell weight, shell thickness and shell defects (Tab. V), showed that all the parameters mentioned, with the exception of egg weight, were poorer in the experimental group of animals. In view of the relevant literature data, the results obtained were considered as being related to the consumption of saline underground waters with almost 20-fold higher concentrations of sodium and chlorides (Tab. III, IV).

REFERENCES

- ANONYMOUS (1993): Guidelines for drinking water quality. WHO Recommendations, Vol. 1, 172–181.
- ANONYMOUS (1994): Pravidnik o zdravstvenoj ispravnosti vode za pice. Narodne Novine, 46, 1596–1575.
- BALNAVE, D. (1993): Influence of saline drinking water on egg shell quality and formation. *World Poultry Sci. J.*, 49, 109–119.
- BALNAVE, D. – YOSELEWITZ, I. (1987): The relation between sodium chloride concentration in drinking water and eggshell damage. *Brit. J. Nutr.*, 58, 503–509.
- BALNAVE, D. – ZHANG, D. (1992): Responses in egg shell quality from dietary ascorbic acid supplementation of hens receiving saline drinking water. *Aust. J. Agric. Res.*, 43, 1259–1264.
- BALNAVE, D. – ZHANG, D. – MORENG, R. E. (1991): Use of ascorbic acid to prevent the decline in eggshell quality observed with saline drinking water. *Poultry Sci.*, 70, 848–852.
- BOŽIČKOVIĆ, P. – KRALJ, M. – HERCEG, M. – TIMET, D. – HUBRIH, I. – ZEČIĆ, L. J. (1974): Prilog poznavanju toksičnosti NaCl- a u peradi. *Vet. Stanica*, 5, 15–21.
- FAYEZ M. – MARAI, I. – ALNAIMY, M. – HABEEB, A. (1994): Effect of salinity of drinking water on farm animals. In: AP DEWI, I. – AXFORD, R. F. E. – FAYEZ M. – MARAI, I. – OMED, H. (eds): Pollution in livestock production systems. Wallingford, CAB International, pp. 119–135.
- HARBANGH, D. D. – SANFORD, P. E. (1970): The effect of various levels of zinc-methionine supplement on flock performance, egg size and shell quality. *Poultry Sci.*, 49, 1393.
- MORENG, R. E. – BALNAVE, D. – ZHANG, D. (1991): Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. *Poultry Sci.*, 70, 776–779.
- YOSELEWITZ, I. – BALNAVE, D. (1989): The influence of saline drinking water on the activity of carbonic anhydrase in the shell gland of laying hens. *Aust. J. Agric. Res.*, 40, 1111–1115.

Received: 97-02-19

Accepted after correction: 97-07-18

Contact Address:

Asst. Professor Alenka Hadžiosmanović, Ph.D., Department of Animal Hygiene, Environment and Ethology, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Heinzelova 55, 10000 Zagreb, Republic of Croatia
Tel. 385/1/239 02 93, fax 385/1/21 46 97

IMMUNOSUPPRESSION IN DOGS WITH PYODERMA AND/OR DEMODICOSIS*

IMUNOSUPRESE U PSŮ S PYODERMÍÍ A DEMODIKÓZOU

M. Toman¹, M. Svoboda², J. Rybníček², J. Krejčí¹, M. Faldyna¹ O. Bárta¹

¹ *Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*

² *Faculty of Veterinary Medicine, Veterinary and Pharmaceutical University, Brno, Czech Republic*

ABSTRACT: The occurrence of decreased activity of the immune system was studied in a group of 66 dogs with various combinations of pyoderma and demodicosis. Our complex examination of the dogs included the following: leukocyte count, differential count, phagocytosis, blastogenic lymphocyte transformation and quantitation of total serum immunoglobulins, lysozyme and haemolytic complement. Immunosuppression was found in 19 (28.8%) cases. Immunosuppression was rare in dogs with demodicosis and did not appear without a concurrent pyoderma. An increase in the neutrophil counts and total serum immunoglobulin levels significant was found in dogs with demodicosis combined with pyoderma. On the contrary, marked immunosuppression was detected in dogs with deep pyoderma. A considerable immunosuppression was present in 7 of 10 German shepherds dog pyoderma (GSP). Significant depressions were found in phagocyte activity and lymphocyte activity. Immunosuppression was observed in 4 of 9 dogs in other breeds with uncomplicated deep pyoderma. All groups of dogs with pyoderma showed a significant increase in total serum immunoglobulins. Conclusion from these findings is that deep pyoderma more than Demodicosis was concerned with immunosuppression. German shepherds with deep pyoderma had more expressed immunosuppression than other breeds.

dog; demodicosis; pyoderma; phagocytosis; lymphocyte activity; immunosuppression

ABSTRAKT: Ve skupině 66 psů s různými kombinacemi demodikózy a pyodermie jsme sledovali výskyt snížené aktivity imunitního systému. Komplexní imunologické vyšetření zahrnovalo celkový a diferenciální počet leukocytů, test fagocytózy, test blastické transformace, stanovení hladiny celkových imunoglobulinů, cirkulačních imunokomplexů a lysozymu a test hemolytické aktivity komplementu. Imunosupresi jsme zaznamenali v 19 (28,8 %) případech. Imunosuprese byla ojedinělá u psů s demodikózou bez současného výskytu pyodermie. U psů s demodikózou v kombinaci s pyodermií jsme našli statisticky významný vzestup počtu neutrofilů a celkové hladiny imunoglobulinů. Častější a výraznější útlum aktivity imunitního systému jsme naopak pozorovali u psů s hlubokou pyodermií. Nejvýraznější změny jsme zaznamenali u hluboké pyodermie německých ovčáků, kde bylo postiženo sedm z 10 vyšetřovaných psů a fagocytární aktivita a aktivita lymfocytů v testu blastické transformace byla významně snížena. U ostatních plemen psů s výskytem hluboké pyodermie bez příznaků jiné choroby jsme imunosupresi zaznamenali ve čtyřech z devíti případů. Všechny skupiny psů s pyodermií měly významnější vzestup hladiny imunoglobulinů. Tyto výsledky je možno sumarizovat takto: Imunosuprese byla spojena především s výskytem hluboké pyodermie. Postižení imunitního systému bylo výraznější u německých ovčáků než u jiných plemen.

pes; demodikóza; pyodermie; fagocytóza; aktivita lymfocytů; imunosuprese

Abbreviations:

GSP – German shepherd dog pyoderma, **LTT** – lymphocyte transformation test, **HC** – haemolytical complement, **Ig** – Immunoglobulin, **PHA** – phytohaemagglutinin, **Con A** – concanavalin A, **PWM** – pokeweed mitogen, **PCS** – precolostral calf serum, **CPM** – counts per minute

INTRODUCTION

Suppression of the immune system activity is often described as a phenomenon accompanying infectious

diseases (Cockerell, 1978; Degen and Breitschwerdt, 1986; Trautwein, 1992). Infectious and parasitic diseases of the skin (especially demodicosis and pyoderma) represent one of the disease

* Supported by the Grant Agency of the Czech Republic (Grant 508/94/1052) and Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Grant No. RE 0034).

groups, in which immunosuppression or immunodeficiency was described. The extent and depth of the immunosuppression and its influence on pathogenesis of these diseases, however, remain controversial.

An inhibition of lymphocytes proliferative activity was described by several authors in dogs affected by demodectic mange (Corbett et al., 1975; Scott et al., 1976; Healley and Gaafar, 1977a, b; Wilkie et al., 1979). The inhibition was apparently due to an immunosuppressive effect of serum factors (Scott et al., 1976). It was suggested that immunodeficiency is a predisposing factor for demodicosis, because *Demodex canis* was also present in a healthy skin (Healley and Gaafar, 1977a). Barta and co-workers demonstrated immunosuppressive factors only in sera of dogs with demodectic mange complicated by a secondary bacterial infection but not in sera of dogs that were free of pyoderma (Barta et al., 1982, 1983). On the other hand, Barriga and coworkers have demonstrated immunosuppression in demodicosis without pyoderma (Barriga et al., 1992).

Pyoderma is a typical secondary infection, in dogs caused mainly with *Staphylococcus intermedius* (Berg et al., 1984). The factors leading to the development of canine pyoderma are skin abnormalities such as skin folds or cornification defects, preexisting ectoparasitism, allergy (atopy, flea allergy, food allergy) or endocrinopathies (hypothyroidism, Cushing's disease) – Ihre (1996). Once a pyoderma has been initiated, immunologic incompetence is often present. Pyoderma-induced immunosuppression is caused by the presence of serum immunosuppressive factors appearing during inflammatory response (Barta et al., 1983; Barta, 1986).

A special form of an aggressive, deep bacterial infection of the skin is the German shepherd dog pyoderma (GSP) – Wisselink et al. (1985); Krick and Scott, 1989). Wisselink and his group have documented a familial predisposition in the German shepherd breed and have hypothesized an autosomal recessive inheritance (Wisselink et al., 1989). Although a defect in the cell-mediated immunity has been documented in a small number of dogs (Miller, 1991; Chabanne et al., 1995), other studies have not been able to elucidate any underlying immunologic abnormality (Wisselink et al., 1988; Rosser, 1993). Allergic disease or hypothyroidism have been detected in some dogs with GSP (Rosser, 1993).

The present study summarizes immunological findings in dogs with pyoderma and/or demodicosis that were treated at the 1st Clinic of Internal Diseases of the Veterinary and Pharmaceutical University in Brno, Czech Republic, in 1993 through 1996. The purpose of this study was to evaluate the occurrence and extent of immunosuppression in these animals and to discuss its contribution to the pathogenesis of the given skin diseases.

MATERIAL AND METHODS

Animals and sampling

Sixty-six dogs with a diagnosis of pyoderma and/or demodicosis were selected from outpatients and hospitalized patients of the 1st Clinic of Internal Medicine of the Veterinary and Pharmaceutical University in Brno. The dogs of various breeds (most often German shepherd, $n = 12$, Doberman pinscher, $n = 8$, Shar-pei, $n = 4$), aged from 3 months to 10 years, were examined by clinical and laboratory methods and treated conventionally. Immunological examination was done in all dogs. Fifty-five clinically normal dogs (13 of them German shepherds) at the Clinic, and fifteen Beagles at the Veterinary Research Institute, Brno, were sampled concurrently and used as controls providing reference values. The latter were sampled repeatedly and samples collected from them were also used as controls of the immunological tests throughout the period of investigation.

Dermatologic examination

A complete dermatologic examination was performed on each patient consisting of the following: detailed anamnesis according to a dermatologic questionnaire, complete physical examination, clinical dermatologic examination, recording and classification of dermal changes and collection of samples for laboratory examination. The skin scrapings were collected repeatedly from at least 3 locations and collected hairs were examined microscopically. Cytologic examinations (Diff Quick) were usually performed from the skin lesions.

Additional examinations were used for exclusion of other diseases: and included the following: examination with Wood's lamp, examination of a cellular debris and hairs obtained by a brush method, skin biopsy examination, cultivation for dermatophytes (on Dermatophyte test medium), bacteriologic culture and determination of antibiotic sensitivity, haematologic and biochemical blood examination, total thyroxin testing and dynamic function tests to differentiate endocrinopathies (TRH stimulation test, and adrenal function tests with high and low doses of dexamethasone suppression).

IMMUNOLOGICAL TESTS

Total and differential leukocyte counts

Total leukocyte counts were determined using the cell counter DigiCell 500. Differential leukocyte counts were made from blood smears by routine haematologic procedures.

Phagocytosis of methacrylate particles

A slight modification of the phagocytosis test using methacrylate particles (MSHP) in whole blood (Větvíčková et al., 1982) was used to examine the phagocytic activity of neutrophils and monocytes. Fifty μl of a suspension of MSHP particles (ARTIM, Praha) were mixed with 100 μl of blood in an Eppendorf-type test tube and incubated at 37 °C for one hour. Twenty μl of Na_2EDTA (10^{-4}M) were added 5 minutes before the end of the incubation. Blood smears were prepared and stained according to Giemsa-Romanowski after the incubation. At least 200 cells were examined in each smear to determine the proportion of leukocyte types and the percentage of phagocytosing cells, i. e., those in which at least 3 particles were engulfed.

Lymphocyte transformation test (LTT)

The lymphocytes were separated from blood on a cell separating medium of density 1.077, (Verografin, Lěčiva Praha). The activity of lymphocytes was examined by a lymphocyte transformation test (Maluish and Strong, 1986) using phytohaemagglutinin (PHA), concanavalin A (Con A) or pokeweed mitogen (PWM) as non-specific mitogens (Kristensen et al., 1982; Toman et al., 1990). The density of the cell suspension was adjusted to 10^6 per 1 ml with RPMI 1640 medium supplemented with L-glutamine, penicillin, streptomycin and 10% of precolostral calf serum. Lymphocytes of 43 dogs were also cultivated in RPMI medium with 10% of autologous serum. Two hundred μl of the cell suspension were pipetted in triplicates into wells of a microtitre plate. Then 20 μl of the respective mitogen were added into each well at an optimal concentration (40 μg per ml for PHA, 10 μg per ml for Con A and PWM). Con A was also added at a suboptimal concentration (0.5 μg per ml). The microplates were incubated for 3 days with ^3H -thymidine labelling for the last 20 hours. The incorporation of ^3H -thymidine was measured with the liquid scintillation counter (Packard Tricarb CA 600, Canberra-Packard Instruments, USA). The results were expressed as stimulation indices calculated as the ratio between the counts per minute (CPM) of mitogen-stimulated cultures and unstimulated control cell samples.

Immunoglobulin level (Ig)

The total immunoglobulin concentration was determined spectrophotometrically measuring the turbidity resulting from addition of zinc sulfate. The procedure was a modification of a method described by McEwan et al. (1970). Twenty-five μl of blood serum were mixed with 1.3 ml of 0.7 mM solution of zinc sulfate, pH 5.8 and the resulting turbidity was measured

at 590 nm after two hours at room temperature. A blank was run with each serum sample. The concentration of Ig was calculated from the readings of the tested sera and standards containing various Ig concentrations.

Lysozyme level

The activity of lysozyme in the blood serum was determined by a spectrophotometric measurement of clarification of a suspension culture of *Micrococcus lysodeicticus* in test tubes (Richter and Procházková, 1986). The ratio of components were adjusted considering the known lower activity of lysozyme in dogs as follows: 50 μl of blood serum in 200 ml of buffer were mixed with 1.5 ml of the bacterial suspension, optical density $\text{OD}_{540} = 0.6000$; the reaction time was 45 min. The determined activity was converted to lysozyme concentration values (mg/l) by a derivation from a calibration curve.

Haemolytic complement (HC) activity

The HC activity was determined by a micromethod described by Barta and Barta (1993). The sera to be tested were separated from the blood within 60 min after sampling and were stored at -70 °C for no more than 3 weeks. A tenfold dilution of the serum was prepared with a barbital buffer containing 0.3 mM CaCl_2 and 1 mM MgCl_2 and 0.1% of gelatin, pH 7.3. Duplicate twofold dilution series were prepared from the basic 1 : 10 dilution in wells of U-type microtitre plates (GAMA, Dalečín). A 1% suspension of sensitized sheep erythrocytes was added to each well. Control wells contained the same serum samples and non-sensitized erythrocytes. After 90 min of incubation in a water bath at 37 °C the complement activity was expressed in terms of the dilution at which a 50% haemolysis occurred. This value was read from a haemolytic curve prepared for each serum sample.

Evaluation of results

The results of immunological tests were used for both individual immunological diagnosis of each patient and the assessment of the immune system activity in groups of dogs with identical or similar clinical diagnoses. The activity of the immune system in groups was evaluated as a percentage of cases with a decreased activity of a given immunological parameter (Tab. I). Laboratory diagnosis of immunosuppression was determined in cases in which two or more parameters were reduced or one parameter was markedly reduced. Cases with reduced activity of at least one parameter repeatedly for more than one month were designated as cases with persisted immunosuppression

or immunodeficiency. Changes of immunological parameters in groups with an identical or similar diagnosis were assessed by a standard statistical procedure using Student's *t*-test.

RESULTS

Occurrence of suppressed immunologic activity

The activity of the immune system was examined in 66 dogs affected by pyoderma and/or demodicosis. Immunosuppression was found in 19/66 (28.8%) of dogs (Tab. II).

The most common findings indicating immunosuppression were: reduced lymphocyte counts (in 7/66; 10.6% dogs), decreased lymphocyte activity in LTT (in 14/63; 21.2% dogs) or immunosuppressive activity of serum in LTT (in 8 of 28 dogs with normal activity of lymphocytes cultivated with precolostral calf serum (PCS); 28.6% and reduced phagocytic activity (in 11/64; 17.2% dogs). On the other hand, increased number of neutrophils were observed in 12/64 (18.8%) cases, increased Ig level in 17/60 (28.3%) cases and increased levels of lysozyme in 11/60 (18.3%) cases. Minimal changes were found in HC activity.

Twenty-eight dogs showed symptoms of superficial pyoderma, and a marked impairment of the immune system was found in 4 (14.3%) of them. Twenty-five dogs had deep pyoderma and immunosuppression was demonstrated in 13 (52.0%) of them. In eleven of these animals deep pyoderma was the principal diagnosis

without symptoms of other diseases. Demodicosis was diagnosed in 37 dogs and immunosuppression was observed in 7 (18.9%) cases, only two of which were without any detectable pyoderma.

Immunologic activity of dogs with the same or similar diagnosis

The activity of the immune system was most markedly suppressed in a group of 10 dogs with GSP (70.0% dogs; Tab. II). A mild inhibition of lymphocyte activity was observed in another one dog. In this group significant inhibitions of phagocytosis and lymphocyte activity were demonstrated (Tab. III). Inhibition of phagocytosis was expressed only in decrease of percentage of phagocytic cells while the absolute number of phagocytic cells was normal. Reduction of lymphocyte counts was insignificant, and moreover, German shepherds in group of healthy animals had also lower lymphocyte counts than other breeds (data not shown). On the other hand, neutrophil counts, monocyte counts and lysozyme level were insignificantly increased but there was a significant increase in the total Ig level. A decreased hemolytic activity was found in two dogs but was not significant in the whole group.

Immunosuppression associated with deep pyoderma in other canine breeds without any signs of another disease was demonstrated in 4/9 (44.4%) cases, but was less severe than in GSP (Tab. II). Inhibition of lymphocyte activity of cells cultivated with PCS was detected in 2 cases and immunosuppressive activity of autolo-

I. Criteria for the decision on reduced or elevated activity in immunological tests

		Parameters of immunological tests ²				
		Markedly reduced	Reduced	Reference values ¹	Elevated	Markedly elevated
Leukocytes	(10 ⁹ /l)		<6.0	7.0–14.0	>15.0	>20.0
Lymphocytes	(10 ⁹ /l)	<1.0	<1.5	2.0–5.0	>6.0	
Neutrophils	(10 ⁹ /l)		<3.0	4.0–9.0	>10.0	>15.0
Monocytes	(10 ⁹ /l)			0.2–0.8	>1.0	
Eosinophils	(10 ⁹ /l)			0.0–0.7	>0.7	>1.2
Phagocytosis	(%)	<40.0	<50.0	55.0–90.0	>95.0	
Lymphocyte transformation						
Rested lymphocytes	(CPM)		<80	200–800	>1000	
Stimulation PHA	(SI)	<3.0	<5.0	10.0–40.0		
Con A (opt. dose)	(SI)	<3.0	<8.0	10.0–50.0		
Con A (subopt. dose)	(SI)	<2.0	<3.0	8.0–30.0		
PWM	(SI)	<3.0	<5.0	10.0–40.0		
Immunoglobulins	(g/l)	<4.0	<5.0	5.0–12.0	>15.0	>20.0
Lysozyme	(g/l)	<0.5	<1.2	1.5–4.0	>5.0	
Haemolytic complement	(CH 50/ml)		<100	100.0–250.0	>300	

SI = stimulation index; CPM = counts per minute

1 = reference values done according to testing of 70 healthy dogs

2 = values of reduced or elevated immunological parameters done by critical analysis of results of testing healthy and diseased dog

II. Survey of dogs with immunosuppression according to the principal diagnosis

Principal diagnosis	Number of animals	Immunosuppression (No. of cases) ¹				
		±	+	++	total	%
Demodicosis without pyoderma	13	2			2	15.4
Demodicosis/superficial pyoderma	18	1	1	1	3	16.7
Demodicosis/deep pyoderma	6	1		1	2	33.3
Superficial pyoderma	10		1		1	10.0
Deep pyoderma	9	1	3		4	44.4
German Shepherd dog pyoderma (GSP)	10	1	2	4	7	70.0
Total superficial pyoderma	28	1	2	1	4	14.3
Total deep pyoderma	25	3	5	5	13	52.0
Total demodicosis	37	4	1	2	7	18.9
Total	66	6	7	6	19	28.8

¹ = immunosuppression (laboratory diagnosis)

± = one parameter reduced

+ = two or more parameters reduced or one parameter markedly reduced

++ = more than one parameter markedly reduced

gous serum in another 2 cases. The changes in lymphocyte activity (cultivated with PCS) were not significant in the whole group (Tab. III). Immunoglobulin levels and lysozyme levels were significantly increased.

Immunosuppression was detected only in one of 10 dogs with superficial pyoderma without any signs of another disease (two with flea bite hypersensitivity). A mild inhibition of LTT (one inhibition of lymphocyte activity, one immunosuppressive action of serum) was detected in two dogs with superficial pyoderma. Slight changes in leukocyte counts were not significant. The only significant changes were the elevation of immunoglobulin level.

Minimum changes of the immune system activity were observed in a group of 13 dogs with localized demodicosis without pyoderma. There were only two animals with mild immunosuppression (reduction of phagocytosis). The animals had neither inhibition of lymphocyte function nor immunosuppressive activity of their sera. There were no statistically significant changes in this group.

Three of 13 dogs with generalized demodicosis and superficial pyoderma and 2 of 6 dogs with localized or generalized demodicosis and deep pyoderma expressed immunosuppression (Tab. II). Among the dogs with demodicosis and deep pyoderma the most serious impairment (lymphopenia with a severe depression of lymphocyte activity) had a German shepherd dog with localized demodicosis and deep folliculitis. Other immunosuppressed dogs had generalized form of demodicosis. Animals with demodicosis and pyoderma had neutrophil counts and Ig levels that were significantly increased. Reduction of activity in LTT which was demonstrated in individual animals (4 cases with inhibition of lymphocytes, 2 another with immunosuppressive activity of sera) were insignificant in the whole group (Tab. III).

DISCUSSION

The role of immunosuppression in the pathogenesis of demodicosis and pyoderma remains unresolved. Our present pilot study gives results of complex immunologic examinations of cell functions and humoral factors in 66 dogs with various combinations of demodicosis and pyoderma. This broad collection of data was gathered over several years from patients with various combinations of symptoms and at different stages of the diseases. Therefore we have used two systems of evaluation to determine the immunosuppression and its extent. Firstly we compared the immunologic profile of the animal with reference values obtained from healthy dogs to determine the degree of immunosuppression and to group the animals according to their principal diagnosis. In the statistical evaluation, on the other hand, we tried to group the animals into groups of the same disease combination and compare this group with an appropriate control group.

Our findings indicate that demodicosis alone causes no or only a very mild immunosuppression with a significant increase in neutrophil counts. This supports neither the previous reports on lymphocyte function inhibition in demodicosis (Corbett et al., 1975; Scott et al., 1976; Barriga et al., 1992; Paulík et al., 1996b), nor the report on the occurrence of serum-mediated immunosuppression (Scott et al., 1976; Paulík et al., 1996a). Immunosuppression was more often in animals with generalized demodicosis but in these dogs also pyoderma was expressed. Findings of lymphocyte activity inhibition per se or through serum immunosuppressive factors in dogs with demodicosis accompanied with pyoderma are in agreement with the notion that immunosuppression in demodicosis requires a secondary pyogenic infection (Barta et al., 1982, 1983).

III. Immunological profiles of dogs with demodicosis and/or pyoderma

	Controls (n = 55)	Demodicosis (n = 13)	Demodicosis with superficial pyoderma (n = 18)	Demodicosis with deep pyoderma (n = 6)	Superficial pyoderma (n = 10)	Deep pyoderma (n = 9)	German shepherd deep pyoderma (n = 10)
Age (years)	2.8 ± 1.4	1.8 ± 0.7	2.7 ± 2.2	2.4 ± 1.2	1.3 ± 0.7	4.6 ± 2.2	4.5 ± 2.3
Leukocytes (10 ⁹ /l)	10.5 ± 3.0	10.8 ± 2.7	13.1 ± 3.2*	13.5 ± 3.9*	12.5 ± 5.3	12.0 ± 4.1	12.5 ± 5.5
Lymphocytes (10 ⁹ /l)	3.2 ± 1.4	3.0 ± 1.4	2.8 ± 1.1	2.7 ± 0.9	2.8 ± 1.0	3.3 ± 2.2	2.3 ± 1.0
Neutrophils (10 ⁹ /l)	6.5 ± 2.1	6.2 ± 2.6	8.9 ± 3.0*	9.8 ± 3.9*	8.3 ± 4.9	7.5 ± 3.3	8.2 ± 5.5
Monocytes (10 ⁹ /l)	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.3	0.7 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.9 ± 1.0	0.6 ± 0.5	0.9 ± 0.5*
Phagocytosis (%)	76.5 ± 18.9	78.5 ± 15.4	77.4 ± 18.8	78.2 ± 11.5	73.1 ± 10.5	72.0 ± 21.5	59.4 ± 20.0*
	(10 ⁹ /l)	5.4 ± 1.3	5.3 ± 1.0	7.4 ± 1.8	8.1 ± 1.2	6.7 ± 1.0	5.4 ± 1.8
Lymphocyte transformation ¹							
Rest lymphocytes (CPM)	438 ± 378	870 ± 920	767 ± 420	375 ± 157	372 ± 178	292 ± 152	564 ± 498
Lymphocytes stimulated with							
PHA (SI)	20.1 ± 13.4	16.7 ± 18.5	15.9 ± 14.9	16.1 ± 7.3	23.0 ± 20.1	14.3 ± 12.3	5.6 ± 6.0*
Con A (opt. dose) (SI)	28.2 ± 19.6	22.8 ± 20.6	23.6 ± 15.1	19.4 ± 19.7	27.3 ± 24.3	24.4 ± 23.9	11.7 ± 7.6*
Con A (subopt. dose) (SI)	18.4 ± 12.6	15.4 ± 16.0	17.8 ± 10.7	16.2 ± 11.7	17.6 ± 16.7	16.2 ± 11.5	7.5 ± 5.6*
PWM (SI)	16.2 ± 10.3	13.5 ± 11.5	12.6 ± 9.6	10.9 ± 10.6	11.8 ± 8.7	10.2 ± 8.9	8.2 ± 7.8*
Immunoglobulins (g/l)	7.6 ± 2.6	9.4 ± 5.4	10.9 ± 5.3*	13.1 ± 4.5*	12.0 ± 5.6*	13.4 ± 3.5*	15.4 ± 6.5*
Lysozyme (g/l)	2.7 ± 1.7	2.9 ± 1.0	3.5 ± 2.1	3.9 ± 1.7	4.3 ± 3.0	5.0 ± 2.6*	4.2 ± 2.7
Haemolytic complement (CH 50/ml)	162 ± 68	150 ± 94	209 ± 98	148 ± 68	183 ± 77	203 ± 87	123 ± 101

SI = stimulation index; CPM = counts per minute

* = significant changes against control ($p = 0.05$)¹ = lymphocyte transformation test done with precolostral calf serum

Findings of deep pyoderma (alone or in combination with other diseases) correlated in our study with the increased percentage of immunosuppressed dogs. The immunosuppression was shown namely by a depression of lymphocyte function, although these changes did not reach statistical significance. Dogs with any type of pyoderma had a statistically significant increase of the Ig level and insignificant increase of lysozyme level. This indicates an inflammatory reaction that need not to be associated with an immunosuppression. Most pyodermas are caused by staphylococcal infection. DeBoer (1994) demonstrated a direct immunosuppressive effect of staphylococci *in vitro*. Therefore the effect of staphylococci *in vivo* on immunosuppression cannot be excluded. On the other hand, most pyodermas are secondary diseases and it is obvious that accompanying diseases contribute to the clinical course. To evaluate the isolated effect of pyoderma on the development of immunosuppression in a clinical study such as was this one, is not possible. Flea bite hypersensitivity is mentioned as a predisposing factor for the development of pyoderma (Mason and Lloyd, 1989). We observed this hypersensitivity in some animals with superficial pyoderma, but it had no effect on changes of the immune system.

Based on our findings we suggest that immunosuppression appears during pyoderma, but its occurrence, severity and duration depend on the stage and duration of its development and on the primary disease. We were able to prove suppression of lymphocyte activity in individual patients and in mean values of the group with deep pyoderma but without a statistical significance.

On the other hand, the occurrence of immunosuppression was clearly and significantly present in GSP. German shepherds had deep pyodermas more often and more pronounced than other breeds, which supports the image of GSP as a nosologic entity (Krick and Scott, 1989; Ihrke, 1996). This has to be further analyzed, as there are several possible explanations for immunosuppression in this case. In most animals with GSP the activity of lymphocytes per se was inhibited as they showed dysfunction even in presence of non-suppressive newborn calf serum. The lymphocyte dysfunction was more severe than in other breeds. Interestingly, both diseased and healthy German shepherds had lower lymphocyte counts than other breeds. In agreement with other authors (Miller, 1991; Chabane et al., 1995) it seems that GSP is associated with lymphocyte deficiencies. This does not contradict the statement of Wisselink and coworkers on a full immunocompetence of German shepherds (Wisselink et al., 1988), because these authors did not study lymphocyte activity. On the other hand, a possible neutrophil deficiency must be further tested. We have found an inhibition of phagocytosis, but tested it only with regard to ingestion, which is not as often detected as cause of immunodeficiency as is chemotaxis or metabolic disorders (Degen and Breitschwerdt, 1986). Wisselink et al., (1988) did not find any

deficiency in chemotaxis or bactericidal activity and we could not find it using the chemiluminescence technique (Tomán et al., unpublished data). It is known that various tests for different phases of phagocytosis have poor correlations (Roth and Kaeblerle, 1981; Winter and Buschmann, 1987). Our findings of increased Ig levels and unchanged hemolytic complement activity are in agreement with the findings of Wisselink et al. (1988).

Based on our findings, it can be concluded that deep pyoderma rather than demodicosis was concerned with immunosuppression. German shepherds with deep pyoderma had more expressed immunosuppression than other breeds.

Acknowledgments

The authors are grateful to Mrs. Tamara Bílková, Hana Kudláčková and Mr. Zdeněk Jedlička for their excellent technical assistance.

REFERENCES

- BARRIGA, O. O. – AL-KHALIDI, N. W. – MARTIN, S. – WYMAN, M. (1992): Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **32**, 37–46.
- BARTA, O. (1986): Immunomodulatory effect of serum on lymphocytes – Consequences for the study of immunostimulants *in vitro* and *in vivo*. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **9**, 193–203.
- BARTA, V. – BARTA, O. (1993): Testing of hemolytic complement and its components. In: BARTA, O. (ed.): *Veterinary Clinical Immunology Laboratory*. BAR-LAB, Blacksburg, VA, p. C6-1.
- BARTA, O. – WALTMAN, C. – SHAFFER, L. M. – OYEKAN, P. P. (1982): Effect of serum on lymphocyte blastogenesis. I. Basic characteristic of action by diseased dog serum. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 567–583.
- BARTA, O. – WALTMAN, C. – OYEKAN, P. P. – McGRATH, R. K. – HRIBERNIK, T. N. (1983): Lymphocyte transformation suppression caused by pyoderma – failure to demonstrate it in uncomplicated demodectic mange. *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.*, **6**, 9–17.
- BERG, J. N. – WENDELL, D. E. – VOGELWEID, C. et al. (1984): Identification of the major coagulase-positive *Staphylococcus* sp. of dogs as *Staphylococcus intermedius*. *Am. J. Vet. Res.*, **45**, 1307–1309.
- CHABANE, L. – MARCHAL, T. – DENEROLLE, P. – MAGNOL, J. P. – FOURNEL, C. – MONIER, J. C. – RIGAL, D. (1995): Lymphocyte subset abnormalities in German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **49**, 189–198.
- COCKERELL, G. L. (1978): Naturally occurring acquired immunodeficiency diseases of the dog and cat. *Vet. Clin. North Amer.*, **8**, 613–628.
- CORBETT, R. – BANKS, K. – HINRICHS, D. – BELL, T. (1975): Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. *Transplant. Proc.*, **4**, 557–559.

- De BOER, D. J. (1994): Immunomodulatory effects of staphylococcal antigen and antigen-antibody complexes on canine mononuclear and polymorphonuclear leukocytes. *Amer. J. Vet. Res.*, *55*, 1690–1696.
- DEGEN, M. A. – BREITSCHWERDT, E. B. (1986): Canine and feline immunodeficiency – Part I. *Comp. Cont. Educ.*, *8*, 313–323.
- HEALEY, M. C. – GAFFAR, S. M. (1977a): Immunodeficiency in canine demodectic mange. I. experimental production of lesions using antilymphocyte serum. *Vet. Parasitol.*, *3*, 121–131.
- HEALEY, M. C. – GAFFAR, S. M. (1977b): Immunodeficiency in canine demodectic mange. II. Skin reaction to phytohaemagglutinin and concanavalin A. *Vet. Parasitol.*, *3*, 133–140.
- IHRKE, J. P. (1996): Bacterial skin disease in the dog. A guide to canine pyoderma. Bayer, Leverkusen, 97 pp.
- KRICK, S. A. – SCOTT, D. W. (1989): Bacterial folliculitis, furunculosis and cellulitis in the German shepherd dog: A retrospective analysis of 17 cases. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *25*, 513–517.
- KRISTENSEN, B. – KRISTENSEN, F. – VANDELDELDE, M. – HIGGINS, R. J. – DE WECK, A. L. (1982): Canine lymphocyte cultures *in vitro*: Evaluation of peripheral blood lymphocyte response to mitogens. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *3*, 439–448.
- MALUISH, A. E. – STRONG, D. M. (1986): Lymphocyte stimulation. In: ROSE, N. R. – FRIEDMAN, H. – FAHEY, J. L. (eds.): *Clinical laboratory immunology*. Washington, D. C., American Society for Microbiology, 274–381.
- MASON, I. S. – LLOYD, D. H. (1989): The role of allergy in the development of canine pyoderma. *J. Small. Anim. Pract.*, *30*, 216–218.
- McEWAN, A. D. – FISCHER, E. W. – SELMAN, I. E. – PENHALE, W. J. (1970): A turbidity test for estimation of immune globulin levels in neonatal calf serum. *Clin. Chim. Acta*, *27*, 155–163.
- MILLER, W. H. Jr. (1991): Deep pyoderma in two German shepherd dogs associated with cell-mediated immunodeficiency. *J. Amer. Anim. Hosp. Assoc.*, *27*, 513–517.
- PAULÍK, Š. – MOJŽISOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – PAULÍKOVÁ, I. (1996a): Evaluation of canine lymphocyte blastogenesis prior and after *in vitro* suppression by dog demodicosis serum using ethidium bromide fluorescence assay. *Vet. Med. – Czech*, *41*, 7–12.
- PAULÍK, Š. – MOJŽISOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – PAULÍKOVÁ, I. (1996b): Lymphocyte blastogenesis to concanavalin A in dogs with localised demodicosis according to duration of clinical disease. *Vet. Med. – Czech*, *41*, 245–249.
- RICHTER, J. – PROCHÁZKOVÁ, J. (1986): Lysozym – Fotometrická metoda. In: PROCHÁZKOVÁ, J. – JOHN, C. (eds.): *Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie*. Praha, Avicenum, pp. 109–110.
- ROSSER, E. J. jr. (1993): German shepherd pyoderma: A prospective study of 12 dogs. *Proceedings of the American Academy/College of Veterinary Dermatology*, *9*, 40–42.
- ROTH, J. A. – KAEBERLE, M. L. (1981): Evaluation of bovine polymorphonuclear leukocyte function. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *2*, 157–174.
- SCOTT, D. W. – SHULTZ, R. D. – BAKER, E. (1986): Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *12*, 203–213.
- TOMAN, M. – KREJČÍ, J. – MENŠÍK, P. – ULMANN, L. (1990): The nonspecific immunostimulation activity of the bacterine of *Bordetella bronchiseptica* in tests on mice and calves. *Vet. Med. – Czech*, *35*, 537–546.
- TRAUTWEIN, G. (1992): Immune mechanisms in the pathogenesis of viral diseases. *Vet. Microbiol.*, *33*, 19–34.
- VĚTVIČKA, V. – FURNÜSEK, L. – KOPEČEK, J. (1982): Phagocytosis of human blood leukocytes: a simple micro-method. *Immun. Lett.*, *5*, 97–100.
- WILKIE, B. N. – MARKHAM, R. J. F. – HAZLETT, C. (1979): Deficient cutaneous response to PHA-p in healthy puppies from a kennel with high prevalence of demodicosis. *Can. J. Comp. Med.*, *43*, 415–419.
- WINTER, M. – BUSCHMANN, H. G. (1987): Measuring phagocytic capacity in polymorphonuclear cells of the pig – a comparison between different assays. *J. Vet. Med. (B)*, *34*, 504–508.
- WISSELINK, M. A. – WILLEMSE, A. – KOEMAN, J. P. (1985): Deep pyoderma in the German shepherd dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *21*, 773–776.
- WISSELINK, M. A. – BERNADINA, W. E. – WILLEMSE, A. – NOORDZIJ, A. (1988): Immunologic aspects of German shepherd dog pyoderma (GSP). *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *19*, 67–77.
- WISSELINK, M. A. – BOUW, S. – der WEDUWEN, S. A. – WILLEMSE, A. (1989): German shepherd dog pyoderma: a genetic disorders. *Vet. Quart.*, *11*, 161–164.

Received: 97-05-16

Accepted: 97-06-09

Contact Address:

MVDr. Miroslav Toman, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Česká republika
Tel. 05/41 32 12 41, fax 05/41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvel.anet.cz

THE IMMUNOMODULATORY EFFECT OF LEVAMISOLE WITH THE USE OF AMITRAZ IN DOGS WITH UNCOMPLICATED GENERALIZED DEMODICOSIS

IMUNOMODULAČNÝ EFEKT LEVAMIZOLU PRI POUŽITÍ AMITRAZU U PSOV S NEKOMPLIKOVANOU GENERALIZOVANOU DEMODIKÓZOU

J. Mojžišová, Š. Paulík, V. Bajová, D. Baranová

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The immunomodulatory effect of levamisole (Decaris tbl.) in the course of acaricide therapy with amitraz (Tactic) on the functional activity of blood neutrophils (% of phagocytizing cells and ingestion capacity) and lymphocytes (blastogenic response to Con A) in dogs with uncomplicated generalized demodicosis (NGD) was studied. The level of examined parameters was evaluated before treatment, week 3 and 7 after the first application of these preparations; and compared with the values of NGD dogs treated only with amitraz and with those in clinically healthy dogs. In comparison with healthy dogs the initial level of examined activities of both cell populations was significantly depressed. A significantly earlier (4 weeks earlier) increase (when compared with values before treatment) of investigated activities of neutrophils and lymphocytes occurred in dogs treated with amitraz and levamisole in comparison with those in dogs treated only with amitraz. It was manifested especially significantly in phagocytosis, the ingestion capacity of neutrophils at this time of therapy has reached the level of those in healthy dogs. Functional activity of lymphocytes in both groups of NGD dogs has not reached a comparable value with that in healthy dogs either at the end of observation. The presented results indicate that significantly earlier improvement of functional activity of phagocytes and lymphocytes in demodectic dogs treated with amitraz and levamisole was connected with the immunorestorative effect of levamisole.

levamisole; amitraz; demodicosis; dogs; phagocytosis of neutrophils; blastogenesis of lymphocytes

ABSTRAKT: Sledovali sme imunomodulačný efekt levamizolu (Decaris tbl.) v priebehu akaricídnej terapie amitrazom (Tactic) na funkčnú aktivitu krvných neutrofilov (percento fagocytujúcich buniek a ingesčná kapacita) a lymfocytov (blastogénna odpoveď ku Con A) u psov s nekomplikovanou generalizovanou demodikózou (NGD). Úroveň sledovaných ukazovateľov bola hodnotená pred ošetrením, 3. a 7. týždeň po prvej aplikácii prípravkov a porovnaná s hodnotami NGD psov ošetrených len amitrazom a s hodnotami klinicky zdravých psov. V porovnaní so zdravými psami bola počiatočná úroveň sledovaných aktivít oboch populácií buniek u demodikózných psov signifikantne depresovaná. U psov ošetrených amitrazom a levamizolom došlo v porovnaní so psami ošetrenými len amitrazom k zreteľne skoršiemu (o štyri týždne) signifikantnému zvýšeniu (oproti hodnotám pred ošetrením) sledovaných aktivít neutrofilov a lymfocytov. Zvlášť výrazne sa to prejavilo pri fagocytóze; ingesčná kapacita neutrofilov už v tomto termíne terapie dosiahla úroveň zdravých psov. Funkčná aktivita lymfocytov u oboch skupín NGD psov nedosiahla porovnateľnú hodnotu so zdravými psami ani na záver sledovania. Prezentované výsledky naznačujú, že zreteľne skoršia a výraznejšia úprava funkčnej aktivity fagocytov a lymfocytov u demodikózných psov ošetrených amitrazom a levamizolom bola spojená s imunoreštaučným efektom levamizolu.

levamizol; amitraz; demodikóza; psy; fagocytóza neutrofilov; blastogéneza lymfocytov

ÚVOD

Levamisol, ako antihelmintikum prvýkrát popísali Thienpont a i. (1966). Následne boli pri levamizole preukázané viaceré imunomodulačné účinky, ktoré zosumarizovali Symoens a i. (1979). Bolo demonštrované, že potencuje viaceré aktivity lymfocytov (napríklad maturáciu T lymfocytov, cytotoxicitu T buniek, blastogénnu odpoveď k mitogénom) a fagocytov (che-

motaxiu, fagocytárnu a baktericídnu aktivitu). Mnoho štúdií s levamizolom bolo zrealizovaných aj u domácich zvierat (Mulcahy a Quinn, 1986; Euzeby, 1986; Blecha, 1988). Zatiaľ však nemáme k dispozícii údaje o imunomodulačnom efekte levamizolu v priebehu akaricídnej terapie demodikózy u psov.

Prvé práce dokumentovali, že generalizovaná demodikóza (GD) psov je doprevádzaná markantnou supresiou T-lymfocytovej odpovede k mitogénom (Scott

a i., 1974, 1976; Corbett a i., 1975, 1976; Hirsh a i., 1975), čo bolo potvrdené mnohými ďalšími pozorovaniami (Healey a Gaafar, 1977; Krawiec a Gaafar, 1980; Kraiss, 1987; Barriga a i., 1992; Paulík a i., 1996a, b a ďalší). Navyac bolo demonštrované, že psy postihnuté GD majú depresovanú aj funkčnú aktivitu krvných fagocytov (Latimer a i., 1983; Schmitt a i., 1994; Mojžišová a i., 1995).

Bolo prezentované, že terapeutické použitie levamizolu nemalo priamy vplyv ani na pôvodu ochorenia, ani na remisiu kožných zmien; avšak sprostredkovalo parciálne zreštaurovanie blastogénnej odpovede krvných lymfocytov k T-bunkovým mitogénom (Scott a i., 1976).

Prezentovaná práca bola zameraná na zistenie úrovne fagocytárnej aktivity krvných neutrofilov a blastogenézy krvných lymfocytov ku Con A u psov s nekomplikovanou GD ošetrovaných levamizolom a amitrazom v porovnaní ku psom s nekomplikovanou GD ošetrovaných len amitrazom a ku klinicky zdravým psom.

MATERIÁL A METÓDY

Pokusné zvieratá a sledovanie

Pozorovanie bolo vykonané na 13 psoch s nekomplikovanou generalizovanou demodikózou (NGD). Psy boli rôzneho pohlavia (osem psov, päť súk), plemena (štyri plemená) a veku (päť mesiacov až tri roky). Diagnóza bola potvrdená parazitologicky – mikroskopický dôkaz pôvodu v hlbokých kožných zoškraboch. Do pozorovania boli zaradené psy, u ktorých kultivačný bakteriologický nález z kožných lézií bol negatívny. Demodikózne psy boli ošetrované buď amitrazom (Taktic; skupina T; $n = 4$) alebo kombináciou amitrazu s levamizolom (Decaris tbl.; skupina T + D; $n = 9$). K prezentovaniu predkladáme výsledky získané počas siedmich týždňov od prvej aplikácie prípravkov. Taktic bol aplikovaný na postihnuté miesta kože (podľa návodu) v dvojtýždňových intervaloch, t. j. v 0. deň, 2., 4. a 6. týždeň (teda štyrikrát); Decaris bol podávaný *per os* v dávke 3,5 mg/kg ž. hm., trikrát v týždni (každý druhý deň) počas celej doby pozorovania (t. j. 21-krát). Hodnotenie úrovne sledovaných ukazovateľov bolo vykonané v 0. deň, 3. a 7. týždeň a porovnané s úrovňou u piatich klinicky zdravých psov (tri plemená; vek deväť mesiacov až tri roky; tri psy a dve suky). Efekt terapeutického ošetrovania u NGD psov bol hodnotený klinicky – intenzitou regresie kožných zmien (ústup zápalového procesu a intenzita narastania srsti na postihnutých miestach kože).

Sledované ukazovatele

K vyšetreniam bola použitá heparinizovaná krv (5 j/ml krvi).

Hodnotenie fagocytárnej schopnosti krvných neutrofilov bolo vykonané podľa metódy Větvíčková a i.

(1982) s použitím 2-hydroxyethylmetakrylátových partikul (HEMA častice; diameter 1,2 μm ; ARTIM Praha). Fagocytárna aktivita (FA) neutrofilov (Ne) bola hodnotená z počtu Ne pri diferencovaní 200 leukocytov a vyjadrená ako percento Ne s minimálne tromi fagocytovanými HEMA partikulami. Ingesčná kapacita Ne (t. j. index fagocytárnej aktivity – IFA) predstavuje podiel počtu fagocytovaných HEMA partikul k počtu Ne.

Krvné lymfocyty boli izolované podľa metódy Procházkovej (1979) s použitím prípravku Ficoll (Pharmacia Biotech. AB, Sweden). Z izolovaných buniek mononukleáry predstavovali viac než 95 %; ich životaschopnosť (hodnotená farbením trypanovou modrou) sa pohybovala nad 95 %. Postup kultivácie, mitogénnej stimulácie a hodnotenia lymfocytovej odpovede ku Con A (25 $\mu\text{g/ml}$; Sigma Chemical Co., USA) fluorescenčnou metódou s použitím ethidium bromidu je popísaný v našej predošlej práci (Paulík a i., 1996a). Úroveň stimulácie lymfocytov je vyjadrená stimulačným indexom (SI).

Štatistické hodnotenie

Získané údaje sú prezentované ako priemer \pm SD a analyzované Studentovým *t*-testom a *t*-testom pre párové hodnoty. Hodnoty rovnajúce sa 0,05 alebo menšie než 0,05 boli považované za štatisticky významné.

VÝSLEDKY

Úroveň hodnotených ukazovateľov funkčnej aktivity krvných neutrofilov a lymfocytov u sledovaných skupín psov uvádza tab. I. Počiatočná funkčná aktivita sledovaných populácií buniek u oboch skupín demodikózných psov (t. j. skupina T + D a skupina T) bola v porovnaní s kontrolou štatisticky nižšia. Najvýraznejší štatistický rozdiel bol v tomto ohľade zaznamenaný pri blastogénnej odpovedi lymfocytov ku Con A (hodnota SI). Východzie hodnoty sledovaných ukazovateľov psov skupiny T a psov skupiny T + D sa štatisticky nelíšili. V ďalších termínoch sledovania bol u oboch skupín NGD psov zaznamenaný postupný, ale diferencovaný vzostup aktivít oboch populácií buniek. U psov ošetrovaných amitrazom štatistická významnosť tohto trendu bola potvrdená až po jeho štvrtej aplikácii (t. j. v siedmom týždni sledovania). Kým FA a IFA neutrofilov dosiahli v tomto termíne takmer porovnateľnú úroveň s kontrolou, blastogenéza lymfocytov ešte stále preukazovala štatisticky nižšiu úroveň ($P < 0,05$). U psov ošetrovaných amitrazom a levamizolom bolo štatisticky významné zvýšenie hodnôt FA, IFA a SI zaznamenané už v treťom týždni sledovania (po druhej aplikácii amitrazu), t. j. o štyri týždne skôr v porovnaní s psami ošetrovanými len amitrazom. Zvlášť výrazne sa to prejavilo pri ingesčnej kapacite neutrofilov, ktorá už v tomto termíne terapie dosiahla úroveň klinicky zdravých psov a na záver sledovania ju dokonca prevýšila. Odpovedavosť lymfocytov aj

I. Funkčná aktivita krvných neutrofilov a lymfocytov u psov s nekomplikovanou generalizovanou demodikózou po ošetrovaní akaricídny prípravkom a jeho kombináciou s levamisolom – Functional activity of blood neutrophils and lymphocytes in dogs with uncomplicated generalized demodicosis after treatment with an acaricide and its combination with levamisole

Odber (týždeň) ¹	Skupina ²	Ukazovatele ³		
		FA	IFA	SI
0.	T + D	47,90 ± 13,87 ^{ab}	4,72 ± 1,49 ^{kde}	1,46 ± 0,10 ^{gh}
	T	51,37 ± 3,59 ^{tc}	5,17 ± 0,26 ^{tf}	1,48 ± 0,44 ^{ti}
1. (3.)	T + D	59,90 ± 12,35 ^d	6,68 ± 1,73 ^{dl}	2,87 ± 0,62 ^{te}
	T	50,15 ± 11,10	5,45 ± 1,06	1,65 ± 0,27 ^t
2. (7.)	T + D	57,76 ± 14,39 ^b	7,45 ± 2,98 ^c	3,34 ± 0,92 th
	T	58,87 ± 4,69 ^c	6,55 ± 0,57 ^f	3,15 ± 0,58 ^{ti}
Kontrola		64,02 ± 4,79	6,44 ± 0,55	5,16 ± 1,37

o = doba po započatí sledovania – time after the beginning of observation; # = \bar{x} ± SD; FA = fagocytárna aktivita – phagocytic activity; IFA = index FA; SI = stimulačný index – stimulation index; T = Taktik; D = Decaris

x = P < 0,05; + = P < 0,01; * = P < 0,001 (vs. kontrola – vs. control)

b, e = P < 0,05; a, f, d, i = P < 0,025; g = P < 0,005; h = P < 0,001

c = P = 0,05 (hodnoty označené rovnakým písmenom sú signifikantne rozdielne – the values designated with identical letter are significantly different)

¹sampling (week), ²group, ³indicators

v tomto prípade bola signifikantne slabšia (P < 0,05) než pri kontrolných psoch.

V priebehu sledovaného obdobia bolo u ošetrovaných psov zaznamenané postupné, v rámci obidvoch skupín NGD psov individuálne diferencované (v počte lézií a ich regresie) zlepšovanie klinického stavu. Výrazný rozdiel v terapeutickom efekte medzi porovnávanými skupinami NGD psov však nebol zaznamenaný.

DISKUSIA

Existuje len limitovaný počet údajov o sledovaní úrovne fagocytózy u psov s demodikózou. Zatiaľ čo niektorí autori zaznamenali depresiu funkčnej aktivity krvných fagocytov u psov s generalizovanou demodikózou (Latimer a i., 1983; Schmitt a i., 1994; Mojžišová a i., 1995), ďalší to nepotvrdili (Müller a i., 1989; Toman a i., 1995). Nami prezentované výsledky opäť dokladujú naše predošlé pozorovania, že percento fagocytujúcich leukocytov a ich ingesčná schopnosť (Mojžišová a i., 1995), ako aj reaktivita lymfocytov k T-bunkovému mitogénom (Paulík a i., 1996a, b) sú výrazne znížené u psov s generalizovanou demodikózou nekomplikovanou sekundárnou bakteriálnou infekciou.

Je známa priama lineárna závislosť medzi vývojom ochorenia a úrovňou supresie blastogenézy krvných lymfocytov u psov s demodikózou (Krawiec a Gaafar, 1980; Barriga a i., 1992; Paulík a i., 1996b). Závislosť opačného charakteru bola dokumentovaná pri terapeutickoeradikácii pôvodcu ochorenia; s remisiou ochorenia dochádza k výraznej úprave blastogénnej odpovede lymfocytov k T-bunkovému mitogénom (Scott a i., 1974, 1976; Hirsch a i., 1975). Podobnú závislosť prezentujeme aj v našom sledovaní. V priebehu terapie amitrazom sa odpovedavosť krvných lymfocytov ku Con A signifikantne zvyšovala. Aj keď v posled-

nom termíne sledovania (t. j. po šiestich týždňoch terapie) ešte nedosiahla úroveň kontrolných psov, jej vzostup v porovnaní s východnou hodnotou predstavoval 113 %.

O vývoji úrovne depresovanej fagocytárnej aktivity krvných neutrofilov u psov s nekomplikovanou generalizovanou demodikózou v priebehu akaricídnej terapie zatiaľ údaje postrádame. V našom sledovaní to demonštrujeme po štyroch ošetrovaniach amitrazom. Percento fagocytujúcich buniek a ich ingesčná schopnosť dosiahli v tom čase už takmer porovnateľnú úroveň s kontrolnými psami. Zvieratá ošetrované amitrazom preukazovali v tomto termíne pozorovania už výrazné zlepšenie klinického stavu. Pri remisii ochorenia sa účinnosť sérového faktora, zodpovedného za supresiu blastogenézy lymfocytov u psov s generalizovanou demodikózou, stráca paralelne s úpravou funkčnej aktivity lymfocytov (Hirsch a i., 1975; Scott a i., 1976). Naše sledovanie nebolo zamerané na štúdium tohto aspektu pri fagocytárnej aktivite. Avšak súbežne prebiehajúce reštaurovanie zníženej funkčnej aktivity fagocytov a lymfocytov po aplikácii amitrazu môže naznačovať na účinnok humorálneho sérového faktora aj pri fagocytoch. Naviac Latimer a i. (1983) prezentujú, že depresia chemotaxie krvných neutrofilov u psov s generalizovanou demodikózou (ale komplikovanou bakteriálnou infekciou) je indukovaná sérovým inhibítorom.

Levamisol je často používaný nielen ako antihelmintikum, ale aj ako imunomodulátor (Brunner a Muscoglat, 1980). Je nešpecifickým potenciátorom fagocytov a lymfocytov (Symoens a i., 1979), zvlášť pri ich depresovaných funkciách. Scott a i. (1976) referujú o parciálnom reštauračnom efekte levamisolu na blastogenézu lymfocytov u psov s generalizovanou demodikózou. Zatiaľ však nemá k dispozícii údaje pojednávajúce o úrovni funkčnej aktivity krvných fagocytov a lymfocytov u psov postihnutých nekomplikovanou generalizovanou demodikózou pri akaricídnej terapii dopl-

nenej aplikáciou levamizolu. Výsledky nášho štúdia poukazujú v tomto ohľade na vhodnosť takejto kombinovanej terapie. Signifikantný vzostup funkčnej aktivity obidvoch nami sledovaných populácií buniek bol zaznamenaný už v prvom termíne hodnotenia (po dvoch týždňoch terapie), t. j. o štyri týždne skôr, ako to bolo preukázané u psov ošetrovaných len amitrazom. Zvlášť výrazný efekt tejto kombinovanej terapie sa prejavil pri ingescnej kapacite neutrofilov. V tejto počiatočnej fáze terapie sa už táto vyrovnala úrovni kontrolných psov a pri ďalšom termíne hodnotenia ju dokonca prevýšila. Podobne, ako pri psoch ošetrovaných len amitrazom, úroveň blastogénnej odpovede lymfocytov bola na záver sledovania aj v tomto prípade nižšia než u kontrolných psov. Výraznejší rozdiel v remisii klinického stavu medzi obidvoimi porovnávanými skupinami demodikózných psov nebol zistený. To poukazuje na to, že aplikácia levamizolu nemala vplyv na klinický priebeh ochorenia a skrátenie doby liečenia.

Prezentované údaje poukazujú na to, že zreteľne skoršia a výraznejšia úprava funkčnej aktivity fagocytov a lymfocytov u demodikózných psov ošetrovaných amitrazom a levamizolom bola spojená s imunoreštauračným efektom levamizolu.

Demodikóza psov je často komplikovaná sekundárnou bakteriálnou pyodermou (Barta a Turnwald, 1983). Pri zápalových kožných ochoreniach rozhodujúcu úlohu v obrane proti patogénnym baktériám zohrávajú neutrofilové (Müller a i., 1989). Ich alterovaná funkčná aktivita je príčinou zvýšenej citlivosti k oportunistickým patogénom (Rotrosen a Gallin, 1987). Vyliečenie z generalizovanej demodikózy vyžaduje v priemere šesť až osem ošetrení (jedno ošetrenie každé dva týždne; t. j. 10 až 14 týždňov terapie) amitrazom (Geary, 1981; Folz a i., 1984; Svoboda a i., 1992); ľahšie prípady 12 až 18 ošetrení (Cannon, 1983; Shirk, 1983; Folz a i., 1984; Svoboda a i., 1992). Pretože počas prvých dvoch až štyroch týždňov terapie generalizovanej demodikózy je eliminácia pôvodcu (Folz a i., 1983) a redukcia imunosupresie (Scott a i., 1976) v počiatočnom štádiu, pretrvávajú riziko komplikácie chorobného procesu pyodermou. Prezentovaný imunoreštauračný efekt levamizolu, zvlášť na fagocyty, môže byť v tomto iniciálnom štádiu akaricídnej terapie rozhodujúcim momentom limitujúcim uplatnenie sa sekundárnej bakteriálnej infekcie. Použitie levamizolu v súčinnosti s akaricídnu terapiou môže mať preto opodstatnenie hlavne v takých prípadoch generalizovanej demodikózy, ktoré si vyžadujú dlhodobjšiu terapiu a pri ktorých tým pretrvávajú potenciálne nebezpečenstvo komplikácie bakteriálnou infekciou.

LITERATÚRA

BARTA, O. – TURNWALD, G. H. (1983): Demodicosis, pyoderma and other skin diseases of young dogs and their associations with immunologic dysfunctions. *Comp. Cont. Educ. Pract. Vet.*, 5, 995–1002.

BARRIGA, O. O. – AL-KHALIDI, N. V. – MARTIN, S. – WYMAN, M. (1992): Evidence of immunosuppression by *Demodex canis*. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 32, 37–46.

BLECHA, F. (1988): Immunomodulation: a means of disease prevention in stressed livestock. *J. Anim. Sci.*, 66, 2084–2090.

BRUNNER, C. J. – MUSCOPLAT, C. C. (1980): Immunomodulatory effects of levamisole. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 176, 1159–1162.

CANNON, R. W. (1983): Amitraz in treatment of canine demodicosis. *Mod. Vet. Pract.*, 64, 899–900.

CORBETT, R. – BANKS, K. – HINRICHS, D. – BELL, T. (1975): Cellular immune responsiveness in dogs with demodectic mange. *Transpl. Proc.*, 7, 557–559.

CORBETT, R. – PERRYMAN, L. E. – GORHAM, J. R. – BELL, T. (1976): The cell mediated immune response: its inhibition and *in vitro* reversal in dogs with demodectic mange. *Fed. Proc.*, 35, 589–592.

EUZEBY, J. P. (1986): Propriétés immunostimulantes du levamisole. Note 2. – Applications en médecine vétérinaire et effets secondaires. *Revue Méd. Vét.*, 137, 499–520.

FOLZ, S. D. – KRATZER, D. D. – CONKLIN, R. D. – NOWAKOWSKI, L. H. – KAKUK, T. J. – RECTOR, D. L. (1983): Chemotherapeutic treatment of naturally acquired generalized demodicosis. *Vet. Parasit.*, 13, 85–93.

FOLZ, S. D. – KAKUK, T. J. – HENKE, C. L. – RECTOR, D. L. – TESAR, F. B. (1984): Clinical evaluation of amitraz as a treatment for canine demodicosis. *Vet. Parasit.*, 16, 335–341.

GEARY, M. R. (1981): Ectodex dog wash: a preliminary report. *Vet. Dermatol. News*, 6, 63–68.

HEALEY, M. C. – GAAFAR, S. M. (1977): Immunodeficiency in canine demodectic mange. II. Skin reactions to phytohemagglutinin and Concanavalin A. *Vet. Parasit.*, 3, 133–140.

HIRSH, D. C. – BAKER, B. B. – WIGER, N. – YASKULSKI, S. G. – OSBURN, B. I. (1975): Suppression of *in vitro* lymphocyte transformation by serum from dogs with generalized demodicosis. *Am. J. Vet. Res.*, 36, 1591–1595.

KRAISS, A. (1987): Zur Proliferationsfähigkeit von Lymphozyten demodikosekranker Hunde bei immunzellstimulierender Therapie. *Tierärztl. Prax.*, 15, 63–66.

KRAWIEC, D. R. – GAAFAR, S. M. (1980): Studies on the immunology of canine demodicosis. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, 16, 669–676.

LATIMER, K. S. – PRASSE, K. W. – MAHAFFEY, E. A. – DAWE, D. L. – LORENZ, M. D. – DUNCAN, J. R. (1983): Neutrophil movement in selected canine skin diseases. *Am. J. Vet. Res.*, 44, 601–605.

MOJŽIŠOVÁ, J. – PAULÍK, Š. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – HIPÍKOVÁ, V. (1995): Imunologické aspekty demodikózy psovitých. In: *Zbor. Symp. Produkcia a zdravie v chove kožušninových zvierat*. Košice-Vysoké Tatry, 14.–15. 12. 1995, s. 12–13.

MULCAHY, G. – QUINN, P. J. (1986): A review of immunomodulators and their application in veterinary medicine. *J. Vet. Pharmacol. Therap.*, 9, 119–139.

MULLER, G. H. – KIRK, R. W. – SCOTT, D. W. (1989): *Small Animal Dermatology*. Philadelphia, PA., W. B. Saunders Co., pp. 376–394.

PAULÍK, Š. – MOJŽIŠOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – PAULÍKOVÁ, I. (1996a): Evaluation of canine

- lymphocyte blastogenesis prior and after *in vitro* suppression by dog demodicosis serum using ethidium bromide fluorescence assay. *Vet. Med.-Czech*, *41*, 7–12.
- PAULÍK, Š. – MOJŽIŠOVÁ, J. – BAJOVÁ, V. – BARANOVÁ, D. – PAULÍKOVÁ, I. (1996b): Lymphocyte blastogenesis to concanavalin A in dogs with localized demodicosis according to duration of clinical disease. *Vet. Med.-Czech*, *41*, 245–249.
- PROCHÁZKOVÁ, J. (1979): Separation of lymphocytes by means of verografin. *Immunol. Zprav.*, *2*, 17–19.
- ROTROSEN, D. – GALLIN, J. I. (1987): Disorders of phagocyte function. *Ann. Rev. Immunol.*, *5*, 127–150.
- SCOTT, D. W. – FARROW, B. R. H. – SCHULTZ, R. D. (1974): Studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *10*, 233–244.
- SCOTT, D. W. – SCHULTZ, R. D. – BAKER, E. (1976): Further studies on the therapeutic and immunologic aspects of generalized demodectic mange in the dog. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, *12*, 203–213.
- SHIRK, M. E. (1983): The efficacy of amitraz in treatment for demodectic mange. A field study. *Vet. Med. Sm. Ann. Clin.*, *78*, 1059–1062.
- SCHMITT, M. – ESSLINGER, J. – SEEGER, K. – BLOBEL, H. (1994): IgA-Defizienz und verminderte Infektabwehr bei Hunden mit chronischen Dermatitis. *Mh. Vet.-Med.*, *49*, 285–287.
- SVOBODA, M. – SVOBODOVÁ, V. – TOMAN, M. (1992): Diagnostika a terapie demodikózy psů. In: Zbor. z 1. kongresu českej a slovenskej asociácie veterinárnych lekárov malých zvierat. Košice, 22.–24. 10. 1992, s. 23–29.
- SYMOENS, J. – ROSENTHAL, M. – De BRABANDER, M. – GOLDSTEIN, G. (1979): Immunoregulation with levamisole. *Springer Semin. Immunopathol.*, *2*, 49–68.
- THIENPONT, D. – VANPARIJS, O. F. J. – RAEYMAEKERS, A. H. M. – VANDENBERK, J. – DEMOEN, P. J. A. – ALLEWIJN, F. T. N. – MARSBOOM, R. P. H. – NIEMEGERS, C. J. E. – SCHELLEKENS, K. H. L. – JANSSEN, P. A. J. (1966): Tetramisole (R 8299), a new potent broad spectrum anthelmintic. *Nature*, *209*, 1084–1086.
- TOMAN, M. – SVOBODA, M. – RYBNÍČEK, J. – SVOBODOVÁ, V. – KREJČÍ, J. (1996): Výskyt imunodeficiencií u psů a možnosti jejich diagnostiky. *Veterinářství*, *7*, 288–291.
- VĚTVIČKA, V. – FORNUSEK, I. – KOPEČEK, J. – KAMÍNKOVÁ, J. – KAŠPÁREK, I. – VRÁNOVÁ, M. (1982): Phagocytosis of human blood leukocytes – a simple micro-method. *Immunol. Lett.*, *5*, 97–100.

Received: 97–05–05

Accepted after corrections: 97–07–24

Kontaktná adresa:

MVDr. Jana Mojžišová, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/321 11–15, fax 095/76 76 75

USE OF THE DATABASE PubMed

VYUŽÍVÁNÍ DATABÁZE PubMed

WORLD WIDE WEB (informační pavučina, web, www, web stránky, domácí stránky aj, synonyma a používané názvy). Sami si budete postupně rozšiřovat rozsah jejího využívání nebo budete vyhledávat spolupráci specialistů. Rozhodně však neváhejte a najdete si nejvhodnější přístup k INTERNETU. Pokud nemáte možnost využít INTERNET na pracovišti, zkuste třeba internetovou kavárnu, které jsou již na dosah téměř všude. Pokud narazíte na nepříkonalný problém, klikněte na E-mail v domácí stránce Výzkumného ústavu veterinárního lékařství a napište, v čem Vám můžeme pomoci. Pro návrat k předcházejícím www stránkám většinou stačí kliknout myši na šipku zpět.

MEDLINE

Bibliografická databáze National Library of Medicine (National Institute of Health, Bethesda). Program PubMed umožňuje přístup uživatelům INTERNETU nejen k údajům této databáze, ale i k dalším informacím, které nejsou do databáze MEDLINE zařazovány (např. názvy všech článků v některých časopisech). Přístup k vyhledávání je na URL adrese <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/PubMed/>. Další možnosti je přístup z web domácí stránky Výzkumného ústavu veterinárního lékařství <http://www.clark.cz/vri>, kde najdete PubMed v části „Další www stránky“.

Pro základní orientaci a využívání informací z PubMed nemusíte kromě základů angličtiny mít zvláštní znalosti, protože vše potřebné od základních údajů až po pokyny pro pokročilé uživatele najdete přímo ve www stránce. Pro pomoc úplným začátečníkům uvádíme základní pojmy:

SEARCH (VYHLEDÁVÁNÍ)

Pokyn k zahájení vyhledávání podle autora nebo podle klíčových slov. Zadání spustíte kliknutím myši na tomto políčku. Nejprve ale musíte uvést, co potřebujete vyhledat a z jaké databáze. Ponechte předvolený MEDLINE (další možnosti, které se Vám objeví po kliknutí na šipku vedle políčka MEDLINE zatím nebudete potřebovat). Klikněte myši na prázdné pole pod MEDLINE a objeví se Vám kurzor blížící se na první pozici v okénku. Teď můžete projevít svoje přání. Pokud uděláte chybu, smažete napsaná písmena stisknutím šipky ve druhém řádku klávesnice počítače. Pokud kliknete myši na začátek chyby, objeví se v tomto místě kurzor a můžete následující text smazat klávesou Delete. Až napíšete svoji volbu, můžete upravit rozsah vyhledávání. Pokud ponecháte nastavení PUBL. DATE LIMIT na předvolbě No Limit, bude program hledat v celé databázi asi 9 milionů záznamů ze 3 800 časopisů. Vyhledávání můžete omezit kliknutím na šipku a potom kliknutím na zvolenou dobu.

NUMBER OF DOCUMENTS TO DISPLAY PER PAGE

Můžete ponechat předvolených 10 záznamů na stranu, vhodnější však je počet záznamů volit větší, např. 200, protože jinak musíte vždy vyžádat přechod na další stranu (příslušný dotaz se objeví na konci strany, kterou posunujete po obrazovce nahoru a dolů šipkami v pravé části obrazovky).

Hledaný termín nebo jméno autora napište do okénka. Malá a velká písmena nejsou rozlišována, u jmen autorů můžete použít iniciály křestních jmen. Vyzkoušejte např. rozdíl mezi Smith L a Smith LB.

U klíčových slov, která jsou hledána i v názvu prací a v abstraktu je vhodné použít pouze kmenovou část slova a proměnnou část nahradit hvězdičkou. Vyzkoušejte např. immunochem* nebo Czech* anebo Slovak*.

S použitím hvězdičky získáte nejen immunochemistry, ale i immunochemical, Czechoslovakia i Czech Republic, Slovakia i Slovak Republic. Pokud použijete příliš široký význam klíčového slova (např. immuno*) dostanete statistice záznamů nebo si program automaticky vyžádá podrobnější zadání.

Pokud použijete více klíčových slov a oddělíte je mezerou, vyhledají se citace, obsahující všechna uvedená klíčová slova. Vyzkoušejte např. sheep goat progesterone (sheep AND goat AND progesterone) sheep progesterone (sheep AND progesterone) goat progesterone (goat AND progesterone)

Z rozdílů v počtu záznamů poznáte, že zadání sheep AND goat vyhledá mnohem méně záznamů, protože mu odpovídají pouze práce, přinášející informace současně o progesteronu u ovcí i koz. Po získání základních zkušeností nebude tento problém obtížné řešit použitím operátorů OR ve verzi programu pro pokročilé uživatele.

Je třeba dávat pozor na možná synonyma nebo jiné tvary jednotného a množného čísla: pig je lépe zadávat jako pig* (zahrne i pigs), ale je třeba pamatovat i na swine a porcine, případně boar a sow.

Výsledek hledání se objeví za několik sekund. Počet vyhledaných záznamů je na začátku sdělení, názvy prací a zdroj následují seřazeny sestupně podle data vydání. Nejnovější práce jsou proto na začátku. Po kliknutí na autora práce se objeví její abstrakt, jehož formát můžete zvolit výběrem v okénku DISPLAY. Předvolba CITATION REPORT je používána nejčastěji. Články, které Vás zajímají, můžete také označit kliknutím do čtverce před každou vybranou citací. Jak můžete vybrané záznamy vytisknout nebo uložit Vám poradí uživatel počítače.

Zkuste také využít možnost výběru podobných publikací kliknutím na SEE RELATED ARTICLES. Dostanete tak mnoho informací, o jejich vhodnosti však musíte rozhodnout sami. Počítač je chytrý, ale pracuje přesně podle pokynů. Pokud zadáte klíčová slova příliš obecně (např. dog) dostanete desetitisíce záznamů. Pokud je více autorů se stejným jménem, vybere je počítač všechny, pokud nezadáte další možnosti programového třídění, např. část adresy. Ale pozor, i český autor může publikovat pod cizí vlajkou, pokud práce vznikne v zahraničí!

Pro vyhledávání časopisů je možno použít program JOURNAL BROWSER. Další možnosti, např. CLINICAL QUERIES, postupně zjistíte sami z informací National Library of Medicine, které máte doslova na dosah ruky.

Program ADVANCED SEARCH umožňuje získání přesnějšího výběru použitím operátorů (AND, OR, NOT) a zadáním pole, ve kterém se termín hledá. Zadává se zkratkou v hranaté závorce za klíčovým slovem. V programu PubMed jsou důležitá zejména tato pole:

AFFL Affiliation (příčlenění) slovo v adrese nebo v názvu pracoviště hlavního autora

ALL All fields (všechna pole) hledá v celém záznamu

AUTH Author name (jméno autora)

ECNO E. C. Number číslo klasifikace enzymu, přidělené Enzyme Commission

JOUR Journal Title (název časopisu) uvádí se ve zkrácené formě, kterou lze ověřit použitím List Terms

MESH MeSH Terms (Medical Subject Headings) klíčové slovo podle indexu MEDLINE

MAJR MeSH Major Topic klíčová slova vybraná zpracovatelem záznamu jako zvlášť významná

PAGE Page Number (číslo strany) první strana publikace

PDAT Publication Date (datum uveřejnění) uvádí se jako rok/měsíc/den (1984/10/06). Uvedení pouze roku zajistí výběr všech článků v požadovaném roce, uvedení roku a měsíce vyhledá články v požadovaném měsíci

TITL Title Words (slova v názvu práce)

WORD Text Words (slova v názvu práce a v abstraktu)

VOL Volume (svazek) číslo svazku časopisu

S tím se však pro začátek netrapte a postupujte nejjednodušším způsobem i za cenu, že nepotřebné údaje nebudete brát v úvahu.

Karel Hruška

EFFECTS OF ENVIRONMENTAL POLLUTANTS ON THE PORCINE AND BOVINE IMMUNE SYSTEMS*

VLIV POLUTANTŮ STÁJOVÉHO PROSTŘEDÍ NA IMUNITNÍ SYSTÉM PRASAT A KRAV

J. Raszyk¹, M. Toman¹, V. Gajdůšková¹, K. Nezveda¹, R. Ulrich¹, A. Jarošová¹,
H. Dočekalová¹, J. Salava², J. Palác²

¹Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic

²District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic

ABSTRACT: Immunological examinations were done in 30 fattening pigs from three swine farms (D., M., T.) and 20 dairy cows from one cattle farm (N.) in the district of Hodonín in 1994. At the same time, samples of stable dust deposits collected in the four farms were analysed for the contents of mercury, cadmium, lead, gamma-HCH (lindane), and total DDT and polychlorinated biphenyls (PCB). Decreased blood level of lysozyme (0.92 mg/l) was found in the swine herd D. Ten percent of the pigs in the herd were affected with purulent skin lesions. The concentrations of the pollutants under study in the dust deposits collected in the herd D. were low. An increased concentration of PCB (0.263 mg/kg) in stable dust but no adverse effects on the immune system were found in the swine herd M. *Eosinophilia* (6.2%), increased extensity of *Ascaris suum* infection (25%) and a high content of lead in stable dust (11.2 mg/kg) were typical of the swine herd T. A high content of lindane (0.139 mg/kg) and an extremely high content of lead (214 mg/kg), which can participate in the immunosuppression of lymphocytes, were found in the cattle herd N. The activity of lymphocytes was depressed in 35% of the cows and the mean value was at the lower limit of the physiological range. Hazardous pollutants can affect the immune system of farm animals and their penetration into the stable environment should be prevented.

swine; cattle; stable dust; mercury; cadmium; lead; lindane; DDT; PCB; immunological tests; phagocytosis; activity of lymphocytes; lysozyme; immunoglobulins; health risks

ABSTRAKT: Ve třech chovech prasat (D., M., T.) a v jednom chovu skotu (N.) na okrese Hodonín bylo v roce 1994 provedeno imunologické vyšetření (celkový počet leukocytů, diferenciální rozpočet leukocytů, test blastické transformace, fagocytární aktivita, lysozym, celkové imunoglobuliny) celkem u 30 výkrmových prasat a 20 krav. Současně byl v těchto chovech vyšetřen stájový sedimentový prach na obsah rtuti, kadmia, olova, gama HCH (lindanu), sumy DDT a sumy polychlorovaných bifenylů (PCB). U prasat v chovu D. byla zjištěna snížená hladina lysozymu v krvi (0,92 mg/l) a současně se u těchto prasat vyskytovaly hnisavé kožní procesy (u 10 % prasat). Hladiny sledovaných polutantů byly ve stájovém prachu chovu prasat D. nízké. V chovu prasat M. byly stanoveny ve stájovém prachu zvýšené hladiny PCB (0,263 mg/kg), které však negativně neovlivnily sledované imunologické parametry u prasat. U prasat v chovu T. byla zjištěna eosinofilie (6,2 %) a současně byl u nich prokázán zvýšený výskyt škrkavek (*Ascaris suum*), a to u 25 % prasat. Ve stájovém prachu chovu prasat T. byla zjištěna zvýšená hladina olova (11,2 mg/kg). V chovu skotu N. byly ve stájovém prachu prokázány zvýšené hladiny lindanu (0,139 mg/kg) a silně zvýšené hladiny olova (214 mg/kg), které se mohou podílet na imunosupresi lymfocytů. Aktivita lymfocytů krav v tomto chovu byla u 35 % krav snižena a celkově byla na dolní hranici referenčních hodnot. Je nutné zabránit pronikání rizikových polutantů do stájového prostředí, protože mohou mít negativní vliv na imunitní systém hospodářských zvířat.

prasata; skot; stájový prach; rtuť; kadmium; olovo; lindan; DDT; PCB; imunologické vyšetření; fagocytóza; aktivita lymfocytů; lysozym; imunoglobuliny; zdravotní riziko

INTRODUCTION

The environment contains many chemicals that may affect the immune system of man and animals (K o l -

l e r, 1979; Z a v á z a l, 1987; W a g n e r a n d W a g - n e r o v á, 1988). These chemicals may also occasionally penetrate into the environment of farm animals (R a s z y k e t a l., 1992a).

* Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Project A 093 95 0084) and the Ministry of Environment of the Czech Republic (Project GA/1650/93).

The effects of these chemicals on the immune system include immunosuppression and induction of hypersensitivity or autoimmune diseases (Luster and Rosenthal, 1993). Thus, for instance, PCB, lead, cadmium and other chemicals rank among immunosuppressive agents (Safe, 1994; Procházková et al., 1990; Skokanová et al., 1993), hypersensitivity can be induced by polycyclic aromatic compounds or organic phosphorus insecticides (Luster and Rosenthal, 1993) and mercury can participate in the induction of autoimmune diseases (Henry et al., 1988; Bigazzi, 1988).

The aim of our investigations was to define the effects of environmental pollutants on the immune system of swine and cattle kept in the district of Hodonín in 1994.

MATERIAL AND METHODS

Immunological tests were conducted and stable dust deposits were analysed for the contents of hazardous environmental pollutants in three swine herds and one cattle herd in the district of Hodonín in 1994.

Farms

1. The pig fattening farm D. housed 17 000 animals in 15 halls. The halls had aluminium mantles and were provided with windows. 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 out which 10 000 were fattened pigs. The construction and ventilation of the halls were the same as described for farm D. Fattened pigs were fed a liquid diet (system Schauer) which completely satisfied the requirement for water. Water used for the preparation of the liquid diet came from the farm's own well.
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 cattle 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 up. The houses were ventilated with a pressure system. The dairy cows were fed roughage and concentrates according to their milk production and watered from drinking bowls. Drinking water came from a public source.

Sampling

Single blood samples for immunological tests were collected from *v. cava* cranialis of 30 pigs of both sexes (1 : 1) aged 240 to 260 days with live weights ranging between 110 and 120 kg, and from *v. jugularis* of 20 cows aged 3 to 4 years on post partum days 30 to 60. The pigs were of the Large White, Landrace, Přeštice, and Duroc breeds and the cattle of the Black Pied and Red Pied breeds.

Single dust samples were collected in the same day as the blood samples, using a vacuum cleaner. The collected dust was screened through a 7-mm mesh sieve. The larger particles were discarded and the smaller ones, making approx. 85% of the total amount, were used for analyses.

Immunological tests

Immunoglobulin and lysozyme levels were determined in serum and the remaining immunological parameters in 5-ml volumes of heparinized blood. Total leukocyte counts were determined using the cell counter Digicell 500. Differential leukocyte counts were determined by the examination of 200 cells in smears stained with Pappenheim. The activity of lymphocytes was assessed in whole blood by the blastic transformation test after stimulation with mitogens (phytohaemagglutinin, concanavalin A) and measurement of the incorporation of ^3H -labelled thymidine into the newly formed DNA. The phagocytic activity was determined by counting intracellular microsphaeric hydrophilic particles and by the calculation of percentage of phagocytizing cells. The metabolic activity of the phagocytizing cells was determined by measuring respiratory burst by chemiluminescence in whole blood after stimulation with rice starch. Luminol and the luminometer Bio Orbit 1251 were used in the test. Lysozyme levels were derived from nephelometric determination of the lytic activity of *Micrococcus lysodeiaticus* using the spectrophotometer Spekol 11. The same apparatus was used for nephelometric determination of total immunoglobulins after their reaction with zinc sulfate. Detailed descriptions of the methods were published elsewhere (Tomán et al., 1990).

Chemical analyses

Cadmium and lead were determined by atomic absorption spectrometry (AAS) in the acetylene-air flame using the Perkin Elmer PE 4000 apparatus. Mercury was determined in the Trace Mercury Analyzer (TMA) using the technique of generation of metallic mercury vapour and the subsequent capture and enrichment in an amalgamator.

Chlorinated pesticides and PCB were determined with the capillary gas chromatograph Varian VISTA with ^{63}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 ether), 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'-DEE, p,p'-DDE, o,p'-DDT, p,p'-DDT, o,p'-DDD, and p,p'-DDD.

The results were processed by the STAT Plus, Version 1.01 programme (Matoušková et al., 1992). Mean values \pm SD are given in the text.

RESULTS

I. The results of immunological examinations of pigs and cattle are presented in Tab. I. Individual deviations from reference values were observed rather frequently. Therefore, only activity decreases or increases recorded in a larger number of animals or deviations of mean values beyond the range of reference values were regarded as significant. The relevant immunological findings can be summarized as follows:

- decreased mean blood lysozyme level (0.92 ± 0.50 mg/l) in pigs on farm D.;

- increased peripheric eosinophil counts in 50% of the pigs on farm T.;
- abrogation of the *in vitro* proliferative response of lymphocytes to phytohaemagglutinin or concanavalin A. in cows on farm N. The mean value was at the lower limit of the laboratory's reference range.

II. The results of chemical analyses of stable dust are presented in Tab. II and III.

The relevant findings can be summarized as follows:

- high content of polychlorinated biphenyls (0.263 mg/kg) in stable dust collected on Farm M. (swine);
- high contents of lead (214 mg/kg) and lindane (0.139 mg/kg) in stable dust collected on farm N. (cattle).

DISCUSSION

The effects of xenobiotics on the immune system are to be interpreted as an intervention into the adaptation mechanisms. The immune system is more sensitive and reacts more promptly than other biological systems. Although no direct link between the increased contents of the pollutants in stable dust and disturbances of the immune system was demonstrated, altered values of the immunological profile are suggestive of it.

Examinations in farm D. revealed a low level of blood lysozyme (0.92 mg/l) which is known to reflect the activity of the macrophage system (Procház-

I. Immunological tests on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.)

		Farm D. (n = 10)	Farm M. (n = 10)	Farm T. (n = 10)	Farm N. (n = 20)
LEUCO	($10^9/l$)	17.5 \pm 3.3	15.8 \pm 2.7	17.2 \pm 3.2	6.7 \pm 1.6
LYMPHO	(%)	50.6 \pm 8.5	56.2 \pm 10.4	59.5 \pm 7.3	59.9 \pm 14.0
NEUTRO	(%)	40.9 \pm 8.6	35.5 \pm 10.0	30.6 \pm 5.6	30.7 \pm 14.4
MONO	(%)	7.2 \pm 8.8	3.6 \pm 1.1	3.8 \pm 1.6	6.2 \pm 2.8
EOSINO	(%)	4.2 \pm 2.3	4.7 \pm 2.3	6.2 \pm 4.9	3.3 \pm 2.4
PHAGOC	(%)	86.0 \pm 4.4	86.2 \pm 7.1	80.0 \pm 22.0	43.9 \pm 21.9
CL-SPONT	(mV)	16.3 \pm 5.5	16.8 \pm 5.6	18.2 \pm 5.5	66.0 \pm 38.8
CL-SI	(SI)	2.7 \pm 0.6	2.9 \pm 0.7	2.3 \pm 0.6	2.9 \pm 0.7
BTL-PHA	(SI)	165.2 \pm 105.2	279.6 \pm 117.1	148.4 \pm 52.9	8.4 \pm 5.2
BTL-Con	(SI)	44.6 \pm 28.1	66.7 \pm 28.2	78.0 \pm 36.5	17.7 \pm 10.7
Ig	(mg/l)	20.7 \pm 1.8	22.6 \pm 2.0	24.2 \pm 1.9	23.5 \pm 3.2
LYSOZ	(mg/l)	0.92 \pm 0.50	1.80 \pm 0.20	1.70 \pm 0.40	0.37 \pm 0.16

LEUCO - total leucocyte count

LYMPHO - percentage of lymphocytes

NEUTRO - percentage of neutrophilic granulocytes

MONO - percentage of monocytes

EOSINO - percentage of eosinophilic granulocytes

PHAGOC - percentage of MSHP particles-phagocytizing cells out of the total number of NEUTRO + MONO

CL-SPONT - chemiluminescence (metabolic activity of phagocytes) of nonstimulated cells

CL-SI - stimulation index; increase of chemiluminescence after stimulation with rice starch

BTL-PHA, BTL-ConA - stimulation indexes in blastic transformation test (stimulation with phytohaemagglutinin and concanavalin A, respectively)

Ig - total immunoglobulin concentration

LYSOZ - serum lysozyme concentration

II. Contents of mercury, cadmium and lead (mg/kg) in stable dust collected on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.)

Farm	Mercury	Cadmium	Lead
D.	0.010	0.146	3.000
M.	0.016	0.231	3.800
T.	0.025	0.177	11.200
N.	0.036	0.060	214.200

III. Contents of gamma HCH (lindane), sum DDT and sum PCBs (mg/kg) in stable dust collected on three swine farms (D., M., T.) and one cattle farm (N.)

Farm	Gamma HCH	Sum DDT	Sum PCBs
D.	0.033	0.013	0.040
M.	0.022	0.023	0.263
T.	0.011	0.007	0.019
N.	0.139	0.034	0.078

ková et al., 1986). The bactericidal activity of lysozyme does not result only from the activity of muramidase, but also from its cationic and hydrophobic properties (Pellegrini et al., 1992). The frequent occurrence of purulent skin lesions in pigs at farm D. might have been related to the low lysozyme levels.

Compared with the remaining two swine farms, the concentrations of mercury, cadmium and lead in stable dust collected in farm D. were the lowest. Also low were the concentrations of lindane, DDT and PCB.

The actual cause of the low lysozyme levels in pigs on farm D. remains unknown.

The first immunological tests in fattening pigs on farm D. were made already in 1984. At that time, the concentrations of IgG, IgM and IgA were depressed by 16.9%, 45.1% and 45.0%, respectively (Raszyk et al., 1992a), and samples of stable dust contained an extreme amount of mercury (0.48 mg/kg) as a result of feeding grain contaminated by the pickling agent phenylmercury chloride. Immunosuppressive effects of feeding such grain, evident from the decrease of serum immunoglobulin (particularly IgA) levels, were later confirmed in our laboratory experimentally (Raszyk et al., 1992b). Immunosuppressive effects of mercury were described in many species of living creatures including man (Koller, 1979).

No significant alterations of immunological profiles were observed in fattening pigs on farm M.

PCB present in stable dust (0.263 mg/kg) collected on farm M. had no effects on any of the immunological parameters under study, although immunosuppressive effects of PCB had been demonstrated in mice, rats, guinea pigs and monkeys under experimental conditions (Safe, 1994). Monkeys exposed for prolonged periods to low concentrations of PCB found currently in environmental investigations developed immunosuppression characterized mostly by lower CD4⁺ : CD8⁺

lymphocyte ratio and weaker antibody responses (Tryphonas et al., 1989).

The increased peripheral eosinophil (Eo) count (6.2%) in fattened pigs on farm T. was obviously due to the high extensity (25%) of *Ascaris suum* infection. The role of Eo in the defense against parasitic infections has generally been accepted (Sun et al., 1991). Products of Eo, particularly the low-molecular major band protein, the cationic protein and peroxidase, are responsible for their helminthotoxic effects (Beneš et al., 1986). No significant alteration was found in any of the remaining parameters of the immunological profile in the pigs on farm T.

The concentrations of gamma HCH, total DDT and total PCB were the lowest on farm T. On the other hand, the concentrations of mercury and lead were moderately higher on farm T. than at the remaining two farms.

Nine of the 20 cows (35%) examined on farm N. showed depressed *in vitro* proliferative activity of lymphocytes stimulated with phytohaemagglutinin or concanavalin A. The mean value of proliferative activity was at the lower limit of the reference range.

The two plant lectins stimulate particularly T lymphocytes and thus the results of the test reflect the level of activity of regulatory and effector mechanisms. The low level of blood lysozyme, found in cows on farm N., did not exceed the range found in cows on other farms.

Stable dust collected on farm N. contained a high amount of lindane (0.139 mg/kg) and an enormously high amount of lead (214 mg/kg). Lindane-contaminated components of feed mixtures or antiparasitic drugs containing lindane as the active component may have been the sources of this chemical, while lead may have originated from lead-contaminated components of mineral supplements or from paint coats.

Depressive effects of lindane on humoral and cell-mediated immunity have been demonstrated in rats (Koller, 1979; Saha and Banerjee, 1993).

Lead ranks among the xenobiotics which inhibit immune reactions and compromise the defense potential of the host (Luster and Rosenthal, 1993). Harmful effects of lead on the central nervous and cardiovascular systems, bone metabolism, reproduction and kidney function have also been described (Goyer, 1993). Epidemiological studies of its effects on the human immune system are rare and their results are controversial and often differ from those of experimental studies (Skokanová et al., 1993).

The burden of lindane and lead on farm N. is rated as serious, because the function of the immune system was impaired. The weak proliferative response of lymphocytes to the mitogens reflects adverse effects on T lymphocytes, which, in addition to their regulatory function, participate in defense events, particularly in the protection against infections by viruses and intracellular bacteria and parasites (Nouza and John, 1987). The more serious impact of the pollutants on

cattle on Farm N. is evident also from the higher count of aberrant cells (4.80%) and from higher concentrations of lead, mercury lindane, and DDT in muscular tissue (R a s z y k et al., 1995).

REFERENCES

- BENEŠ, J. – BARVÍŘOVÁ, M. – HAUSNER, P. – KOLÍN, J. – MENČÍK, M. – NOVÁK, M. – PETRŮ, V. (1986): Alergologie. 1. vyd. Praha, Avicenum. 416 p.
- BIGAZZI, P. E. (1988): Autoimmunity induced by chemicals. *J. Toxic. Clin. Toxic.*, 26, 125–156.
- GAJDŮŠKOVÁ, V. – ULRICH, R. (1992): Využití analýzy specifických kongenerů polychlorovaných bifenyly pro kontrolu potravin a surovin živočišného původu. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 471–478.
- GOYER, R. A. (1993): Lead toxicity: current concerns. *Environ. Hlth Perspect.*, 100, 177–187.
- HENRY, G. A. – JARNOT, B. M. – STEINHOFF, M. M. – BIGAZZI, P. E. (1988): Mercury-induced renal autoimmunity in the MAXX rat. *Clin. Immun. Immunopath.*, 49, 187–203.
- KOLLER, L. D. (1979): Effect of environmental contaminants on the immune system. *Advanc. Vet. Sci. Comp. Med.*, 23, 267–295.
- LUSTER, M. I. – ROSENTHAL, G. J. (1993): Chemical agents and the immune response. *Environ Hlth Perspect.*, 100, 219–236.
- MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K. (1992): STAT Plus – uživatelská příručka, verze 1.01, 1. vyd. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 168 p.
- NOUZA, K. – JOHN, C. (1987): Imunologie zdraví a nemoci. 1. vyd. Praha, Avicenum. 356 p.
- PELLEGRINI, A. – THOMAS, U. – FELLEBERG, R. – WILD, P. (1992): Bactericidal activities of lysozyme and aprotinin against Gram-negative and Gram-positive bacteria related to their basic character. *J. Appl. Bact.*, 72, 180–187.
- PROCHÁZKOVÁ, J. – JOHN, C. a kol. (1986): Vybrané diagnostické metody lékařské imunologie. 1. vyd. Praha, Avicenum. 386 p.
- PROCHÁZKOVÁ, J. – JILEK, P. – VANČUROVÁ, M. (1990): Imunotoxikologie cizorodých látek. *Českoslov. Hyg.*, 35, 102–107.
- RASZYK, J. – DOČEKALOVÁ, H. – RUBEŠ, J. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – MAŠEK, J. – RODÁK, L. – BARTOŠ, J. (1992a): Ekotoxikologické vztahy ve velkovýkrmně prasat lokalizované v oblasti těžby lignitu a tepelné elektrárny. *Vet. Med. – Czech*, 37, 435–448.
- RASZYK, J. – DOČEKALOVÁ, H. – RUBEŠ, J. – NAVRÁTIL, S. – MAŠEK, J. – RODÁK, L. (1992b): Experimentální chronická intoxikace prasat fenylmerkurichloridem. *Veter. Med. (Praha)*, 37, 379–391.
- RASZYK, J. – J. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – ULRICH, A. – NEZVEDA, K. – URBANOVÁ, J. aj. (1995): Ekotoxikologická studie okresu Hodonín zaměřená na ochranu zdraví hospodářských zvířat a potravního řetězce pro člověka. [Závěrečná zpráva pro Ministerstvo životního prostředí České republiky o řešení projektu GA/1650/93]. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 136 p.
- SAFE, S. H. (1994): Polychlorinated biphenyls (PCBs): Environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Crit. Rev. Toxicol.*, 24, 87–149.
- SAHA, S. – BANERJEE, B. D. (1993): Effect of sub-chronic lindane exposure on humoral and cell-mediated immune responses in albino rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 51, 795–802.
- SKOKANOVÁ, V. – KRÍŽ, J. – KODL, M. (1993): Vliv olova na vybrané imunitní ukazatele u dětí. I. Závislost hodnot sledovaných imunitních ukazatelů na hladině olova v krvi. *Českoslov. Hyg.*, 38, 142–150.
- SUN, F. F. – CRITTENDEN, N. J. – CZUK, C. I. – TAYLOR, B. M. – STOUT, B. K. – JOHNSON, H. G. (1991): Biochemical and functional differences between eosinophils from animal species and man. *J. Leukoc. Biol.*, 50, 140–150.
- TOMAN, M. – KREJČÍ, J. – MENŠÍK, P. – ULMANN, L. (1990): Nespecifická imunostimulační aktivita bakterinu Bordetela bronchiseptica v testech na myších a telatech. *Veter. Med. (Praha)*, 35, 537–546.
- THYPHONAS, H. – HAYWARD, S. – Ó GRADY, L. – LOO, J. C. K. – ARNOLD, D. L. – BRYCE, F. – ZAWIDZKA, Z. Z. (1989): Immunotoxicity studies of PCB (Aroclor 1254) in the adult rhesus (*Macaca mulatta*) monkey – Preliminary report. *Int. J. Immunopharmacol.*, 11, 199–206.
- WAGNER, V. – WAGNEROVÁ, M. (1988): Ekoimmunologie. 1. vyd. Praha, Avicenum. 228 p.
- ZAVÁZAL, V. (1987): Imunita a životní prostředí. *Zprávy SEVAC*, 1, 4–8.

Received: 97–06–04

Accepted after corrections: 97–08–14

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, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

Ústav zemědělských a potravinářských informací v Praze

vydává

z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a s gescí České akademie zemědělských věd celkem 10 vědeckých časopisů, které uveřejňují původní vědecké práce, vědecká pojednání, studie a přehledy zahraniční literatury z odvětví zemědělství, potravinářství a lesnictví. Časopisy jsou určeny především pracovníkům výzkumu, vysokých škol, vedoucím pracovníkům, odborníkům ve šlechtitelství a semenářství, plemenářství, ochraně rostlin, veterinářství, vývojových pracovišt' zemědělské techniky, zemědělských staveb aj.

Rostlinná výroba (*Plant Production*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 672,-, jednotlivá čísla Kč 56,-

Živočišná výroba (*Animal Production*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 672,-, jednotlivá čísla Kč 56,-

Zemědělská ekonomika (*Agricultural Economics*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 672,-, jednotlivá čísla Kč 56,-

Lesnictví – Forestry

Měsíčník, formát A4, počet stran 48, předplatné: celoroční Kč 672,-, jednotlivá čísla Kč 56,-

Veterinární medicína (*Veterinary Medicine – Czech*)

Měsíčník, formát A4, počet stran 32, předplatné: celoroční Kč 564,-, jednotlivá čísla Kč 47,-

Potravinářské vědy (*Food Sciences*)

Dvouměsíčník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 306,-, jednotlivá čísla Kč 51,-

Zemědělská technika (*Agricultural Engineering*)

Čtvrtletník, formát A4, počet stran 40, předplatné: celoroční Kč 204,-, jednotlivá čísla Kč 51,-

Ochrana rostlin (*Plant Protection*)

Čtvrtletník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 204,-, jednotlivá čísla Kč 51,-

Genetika a šlechtění (*Genetics and Plant Breeding*)

Čtvrtletník, formát A5, počet stran 80, předplatné: celoroční Kč 204,-, jednotlivá čísla Kč 51,-

Zahradnictví (*Horticultural Science*)

Čtvrtletník, formát A4, počet stran 40, předplatné: celoroční Kč 204,-, jednotlivá čísla Kč 51,-

Objednávku zašlete na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací

referát odbytu
Slezská 7
120 56 Praha 2

CHANGES IN OVARIAN ACTIVITIES AFTER SUPEROVULATORY TREATMENT OF SHEEP

ZMENY OVARIÁLNYCH AKTIVÍT PO SUPEROVULAČNOM OŠETRENÍ OVIEC

M. Molnárová, B. Pástorová

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Serine proteases are involved in a number of biological processes requiring degradation of intracellular matrices in tissue growing and its rebuilding. These are situations during the growth and maturing of ovarian follicles and their conversion into corpus luteum. Trypsin activity of similar serine proteases are controlled by their inhibitors whose synthesis and secretion is regulated by endocrine, paracrine as well as autocrine mechanisms. The fertility in natural ovarian cycle is ensured by the balance between a number of factors. After superovulatory stimulations this balance is impaired to a different degree. The presented study has been aimed at the investigations of the effect of various combinations of serum gonadotropins (PMSG, Antex Leo, Denmark), choriogonadotropins (hCG, Praedyn, Lěčiva Praha, CR), follicle-stimulating hormone (FSH, Foliocotropin, Spofa, Lěčiva Praha, CR) and anti-PMSG (goats antiserum against PMSG, Bioveta Ivanovice, CR) administered in the oestrus period after synchronization (12 days) by Agelin vaginal sponges (20 mg of chlorosuperlutine per animal; Galena Komárov, SR) on changes of some reproduction characteristics in ovaries and levels of catecholamines in follicular fluid. Changes in the ovarian weight were statistically significant in groups after administration of combined PMSG + hCG (750 + 750 IU; $p < 0.01$), PMSG + hCG + anti-PMSG (750 + 750 + 5 ml; $p < 0.02$) doses of hormones and FSH (2 x 80 + 2 x 80 + 1 x 40 + 1 x 40 IU; $p < 0.01$) during 4 days. Average numbers of prominating follicles and trypsin-inhibitory activity (TIA) values of their follicular fluid (FT) were influenced by LH component of stimulating hormones what was, on the contrary, manifested as by occurrence of the category of follicles over 10 mm as by their significantly higher TIA FT ($p < 0.01$). Inasmuch as mean values of TIA blood plasma which were on average 10 times lower than in FT, were changed in a different way, it is supposed that synthesis and secretion of TIA in FT is affected by local mechanisms (Gosden et al., 1988; Smokovitis et al., 1988; Monget et al., 1996). It follows from studies of the used hormonal preparations on levels of catecholamines in ovine follicular fluid that DA and NE concentrations changed in dependence on the superovulatory stimulation used. Administration of PMSG (1000 IU) resulted in significant decrease of DA levels ($p < 0.01$) and EPI ($p < 0.05$) in ovine follicular fluid. Anti-PMSG serum application partially modified the DA and EPI levels to those of the control group. After hormonal stimulation by PMSG and hCG different effect has been observed. Antisergon application after the given combination of hormones had no effect on the EPI and NE levels in ovine follicular fluid but resulted in the increase of DA content ($p < 0.05$). The most conspicuous effect on the catecholamine level in follicular fluid was induced by FSH after which follows a marked increase of DA ($p < 0.01$) and NE ($p < 0.01$) levels. Similar significant effect of FSH on the change of catecholamine levels and on MAO activity in reproductive organs of sheep and in regulatory regions of reproduction were recorded in our previous contributions.

follicular fluid; inhibitors of serine proteases; catecholamines; PMSG; hCG; anti-PMSG; FSH

ABSTRAKT: Serinové proteázy sa zúčastňujú pri raste a dozrievaní ovariálnych folikulov a ich premene na žlté teliesko. Aktivity proteáz sú kontrolované ich inhibítormi, ktorých syntéza a sekrécia je pod endokrinnou ale aj parakrinnou a autokrinnou kontrolou. V našej práci sme sledovali vplyv sérových gonadotropínov (PMSG), choriogonadotropínov (hCG), antisergónu (anti-PMSG) a folikuly stimulujúceho hormónu FSH na zvýšenie hmotnosti ovárií, ktoré boli štatisticky významné ($p < 0,02$ až $p < 0,01$) u skupín s kombinovanými a frakcionovanými dávkami podaných hormónov, na zmeny inhibičných aktivít folikulárnej tekutiny (FT) proti trypsínu (TIA, trypsin modelová serinová proteáza), ktoré boli ovplyvnené LH zložkou stimulačných hormónov, čo sa prejavilo výskytom kategórie folikulov väčších ako 10 mm a ich vyššími TIA FT ($p < 0,01$). Keďže priemerné hodnoty TIA krvnej plazmy (KP), ktoré boli v priemere 10x nižšie ako vo FT, sa menili odlišne, domnievame sa, že syntéza a sekrécia TIA vo FT je modulovaná lokálnymi mechanizmami (Gosden a i., 1988; Smokovitis a i., 1988; Cajander, 1989; Monget a i., 1996). Koncentrácie katecholových amínov epinefrínu (E), dopamínu (DA) a norepinefrínu (NE) sa vo FT menili tiež v závislosti od použitej stimulácie.

folikulárna tekutina; inhibítory serinových proteáz; katecholamíny; PMSG; hCG; anti-PMSG; FSH

Folikulárna tekutina tvorí mikroprostredie vyvíjajúceho sa oocytu. Jej zloženie je ovplyvňované endokrinnými, ale aj parakrinnými a autokrinnými mechanizmami. Zložky bielkovinového či peptidového charakteru majú v týchto dejoch kľúčový význam. Ich koncentrácie sú výsledkom syntézy, sekrécie a degradačných procesov, ale aj, najmä v predovulačnej fáze v dôsledku zvýšenej priepustnosti folikulárnej membrány, môžu byť extrafolikulárneho pôvodu. Kvantitatívne aj kvalitatívne zmeny medzi proteázami a ich prirodzenými inhibítormi v tkanivách sú riadené hormonálne a ich nerovnováha pri raste, dozrievaní a ovuláciách ovariálnych folikulov môže spôsobiť celý rad porúch plodnosti (Imoedemhe a Shaw, 1986; Reich, 1986; Rom, 1987; Pellicer, 1988). Preparáty používané na superovulačné stimulácie sú často zmesou gonadotropných hormónov – folikuly stimulujúceho (FSH) a luteinizačného (LH) v rôznom pomere. V prirodzenom ovariálnom cykle sa zložka LH uplatňuje najmä v neskej folikulárnej fáze a okrem iných pochodov spúšťa sled proteolytických reakcií vedúcich k ruptúre folikulu (Murdoch, 1985; Cajander, 1989). Keď je LH podaný exogénne predčasne, môže nepriaznivo ovplyvniť činnosť buniek granulózy, ale aj ostatných buniek reprodukčného systému (Moore, 1985). V snahe znížiť na minimum nepriaznivé účinky dlhodobého pôsobenia sérových gonadotropínov (PMSG) robili Bouters a i. (1983) pokusy s podávaním antiséra proti PMSG u kráv. Toto antisérum spôsobilo prudký pokles cirkulujúcich estrogénov (E_2) a v závislosti od času podania ovplyvňovalo počty ovulácií a skracovalo rujové prejavy. Zmeny koncentrácií katecholamínov vo folikulárnej tekutine v priebehu ovariálneho cyklu ošipovaných, ich signifikantné zvýšenie pred ovuláciou zistili Bahr a Ben-Jonathan (1985) a predpokladajú ich fyziologickú úlohu v predovulačných dejoch i v luteinizačnom procese. Oikava a Hsueh (1989) predpokladajú na základe výsledkov *in vitro* pokusov na bunkách granulózy krýs, kde zistovali indukciu tkanivových plazminogénových aktivátorov (tPA) spojenú s dôkazom adrenergických neurotransmiterov a β_2 receptorov v ováriách, že existuje intraovariálny adrenergický regulačný mechanizmus. Aj keď potenciálna úloha neurotransmiterov v ovulácii zostáva nejasná a dôležitosti tPA v priebehu rastu folikulu neistá, autori vyslovujú možnosť parakrinné úlohy β -adrenergických agensov v regulácii tPA – ovariálnej serínovej proteázy dôležitej pri ovuláciách a prestavbe tkanív. Bodis a i. (1993) sledovali koncentrácie monoamínov, 17- β -estradiolu (E_2) a progesterónu (P_4) vo folikulárnej tekutine žien po superovulačných stimuláciách a zistili rozdiely koncentrácií noradrenalínu (NA) v zreých a cystických folikuloch a domnievajú sa, že vyššie koncentrácie P_4 a NA vo FT sú dôležité pre dozrievanie oocytov a ich schopnosť byť oplodnené, ryhované a implantované. Keďže tieto deje sú asociované s činnosťou proteáz v mikroprostredí ovariálneho foli-

kulu, regulácie na endokrinné, ale aj parakrinné a autokrinné úrovni, sú sledované viacerými autormi (Nya, 1985, 1987; Monget a i., 1993; Yamada, 1995, 1996; Besnard a i., 1996; Khalid a Haresign, 1996).

Predmetom tejto práce bolo porovnať priemerné počty ovariálnych folikulov oviec po superovulačných stimuláciách, inhibičnú aktivitu folikulárnej tekutiny a krvnej plazmy proti modelovej serínovej proteáze trypsínu (TIA) a stanoviť priemerné koncentrácie epinefrínu (EPI), dopamínu (DA) a norepinefrínu (NE) vo folikulárnej tekutine (FT).

MATERIÁL A METÓDY

V pokuse sme použili 30 oviec – bahníc plemena Merino. Priemerná hmotnosť piatich kontrolných oviec bola 46 ± 4.4 kg, pokusných oviec ($n = 25$) 42.4 ± 5.8 kg. Kontrolné ovce boli intaktné, pokusné boli náhodne rozdelené do skupín a boli synchronizované 12 dní vaginálnymi hubkami s Agelínom (20 mg chlór-superlutínu na kus; Galena, Komárov). Po vybratí hubiek bolo za štyri hodiny podané ovciam II. a III. skupiny ($n = 8$) 1 000 IU PMSG, ovciam V. a VI. skupiny ($n = 8$) 750 IU PMSG (Antex Leo, Dánsko), ovciam VII. skupiny ($n = 5$) frakcionované počas štyroch dní 2 x 80 IU, 2 x 80 IU, 1 x 40, 1 x 40 IU v celkovej dávke 400 IU FSH (Foliotropin Spofa, Lčívá Praha). Ovciam IV. skupiny ($n = 4$) bolo 28 hodín po vybratí hubiek aplikovaných 1 000 IU hCG, ovciam V. a VI. skupiny v rovnakom čase aplikovaných 750 IU hCG (Praedyn, Lčívá Praha). Antisergón (kozíe antisérum proti sérovým gonadotropínom, Bioveta Ivanovice) bol podávaný 68 hodín po podaní PMSG v dávkach 3,5 a 5 ml III. resp. VI skupine. Podľa údajov výrobcu 1 ml Antisergónu neutralizuje 300 IU sérového gonadotropínu. Pokusné ovce II., III., a VII. skupiny boli usmrcované 144 h a IV., V. a VI. skupiny 168 h od vybratia Agelínových hubiek. Kontrolné ovce boli sledované počas celého pokusu, t. j. 20 dní. Krv na stanovenie trypsin inhibičných aktivít (trypsin modelová serínová proteáza) bola odoberaná ráno z v. jugularis na heparín, a po centrifugácii uložená pri teplote -25 °C až do analyzovania. Folikulárna tekutina z ovárií oviec bola odoberaná injekčnou súpravou do 5 min po usmrtení zvierata a po centrifugácii uložená pri teplote -25 °C. Na ováriách sme vizuálne stanovili počty ovulácií a prominujúcich folikulov, zmerali objem a hmotnosť ovárií.

Na stanovenie katecholamínov sme folikulárnu tekutinu (50 μ l) pipetovali do skúmaviek s antikoagulačným činidlom (glutathion 0,05 mol/l) a rádioenzymatickou metódou podľa Johnsona a i. (1980) sme za pomoci testu Catechola (Adico, Praha) stanovili hladiny norepinefrínu (NE), dopamínu (DA) a epinefrínu (EPI). Rádioaktivitu 3H o-metylderivátov katecholamínov sme merali na scintilačnom spektrometri Packard Tri Carb v 3H kanáli. Citlivosť metódy je pre 50 μ l

vzorky v rozsahu koncentrácií 0,37 až 400 pmol/l pre EPI, 0,53 až 400 pmol/l pre NE a 0,40 až 400 pmol/l pre DA. Koeficient variácie počítaný z opakovaných vyšetrení je pre EPI 3,1 %, pre NE 4,24 % a pre DA 4,1 %. Hladiny catecholamínov vo folikulárnej tekutine oviec sú vyjadrené ako aritmetické priemery \pm SEM a sú štatisticky spracované *t*-testom pre nepárové súbory.

Na stanovenie inhibičných aktivít (TIA) sme použili metódu stanovenia zvyškových aktivít trypsinu podľa Bartíka (1974) zo spomeného hydrolyzy nízkomolekulového chromogénneho substrátu N-a-tosyl-L-arginínu-4-nitranilidu trypsinom. Vzniknutý 4-nitranilín sme stanovili fotometricky pri 405 nm a inhibíciu vyjadrovali v percentách, keď za 100 % sme pokladali zmenu absorbancie $A_{405} = 1,0$ po 10-minútovej inkubácii pri teplote 25 °C a pH = 8,5. Výsledky sú štatisticky spracované Studentovým *t*-testom.

VÝSLEDKY

Zmeny hmotností ovárií po superovulačných stimuláciách boli štatisticky významné u skupín s kombinovanými a frakcionovanými dávkami podaných hormónov. U kontrol bola priemerná hmotnosť $1,35 \pm 0,39$ g, u II. skupiny $1,97 \pm 1,28$ g (ns), III. skupiny $2,06 \pm 1,62$ (ns), IV. skupiny $2,11 \pm 2,4$ g (ns), ale V. skupina $5,22 \pm 3,88$ g ($p < 0,01$), VI. skupina $3,72 \pm 2,47$ g ($p < 0,02$), VII. skupina $2,24 \pm 0,5$ g ($p < 0,01$). Priemerné počty prominujúcich folikulov a hodnoty TIA ich folikulárnej tekutiny sú uvedené v obr. 1 a 2 a v tab. I. Pre porovnanie uvádzame aj priemerné hodnoty TIA krvnej plazmy, na stanovenie ktorých sme použili desiatnásob-

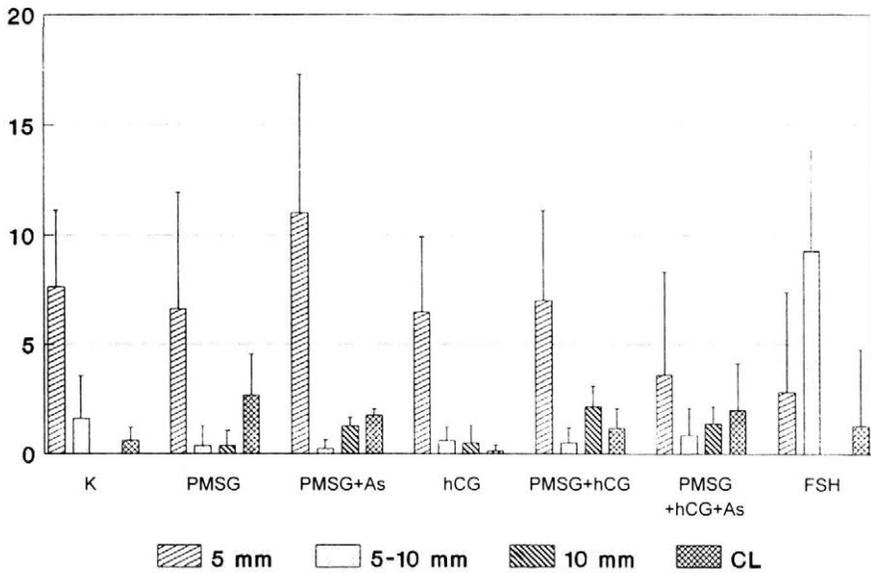
né množstvá krvnej plazmy (100 μ l) oproti folikulárnej tekutine (10 μ l). Stimulácia 1 000 IU PMSG menila počty folikulov nesignifikantne, ale zvyšovala počty ovulácií ($p < 0,02$) a podporila vznik folikulov >10 mm, ktorých TIA bola vyššia ($p < 0,1$) ako TIA folikulov 5 až 10 mm. Podanie antisergónu 68 h po podaní PMSG sa prejavilo (v čase usmrcovania oviec) znížením počtu folikulov 5 až 10 mm ($p < 0,05$), ale zvýšením počtu folikulov >10 mm v neprospech ovulácií. Zvýšený podiel zložky LH v preparáte hCG oproti PMSG spôsobil nesignifikantné zmeny v počte folikulov kategórie 5 až 10 mm a zníženie počtu ovulácií ($p < 0,01$) pri súčasnom štatisticky nevýznamnom zvýšení počtu folikulov >10 mm a ich TIA folikulárnej tekutiny. Podobný obraz sme zistili po podaní kombinácie 750 IU PMSG a za 24 h 750 IU hCG v čase usmrcovania oviec (162 h od podania PMSG), čo sa týka počtu folikulov 5 až 10 mm a ich TIA FT, ale zvýšenie počtu folikulov >10 mm bolo štatisticky významné ($p < 0,01$) oproti PMSG samotnému, zatiaľ čo zmeny TIA FT týchto folikulov boli nesignifikantné. Keď sme antisergónom skrátili dobu pôsobenia PMSG (zo 164 na 68 h) a súčasne hCG (zo 140 na 44 h), prejavilo sa to nesignifikantnými zmenami počtov folikulov kategórie 5 až 10 mm aj >10 mm a TIA FT folikulov 5 až 10 mm. Folikulárna tekutina folikulov väčších ako 10 mm mala štatisticky významne nižšie TIA FT ($p < 0,05$) po antisergóne. Stimulácia 400 IU FSH sa prejavila štatisticky významným zvýšením počtov folikulov 5 až 10 mm ($p < 0,001$) s nižšími hodnotami TIA FT ($p < 0,01$) oproti stimulácii PMSG. Zvýšenie počtov ovulácií bolo štatisticky nevýznamné pre

I. Priemerné počty prominujúcich folikulov a žltých telesok na ováriam a TIA krvnej plazmy a folikulárnej tekutiny po superovulačných stimuláciách – Average counts of protruding follicles and corpus luteum on ovarium and TIA of blood plasma and follicular fluid after superovulation stimulations

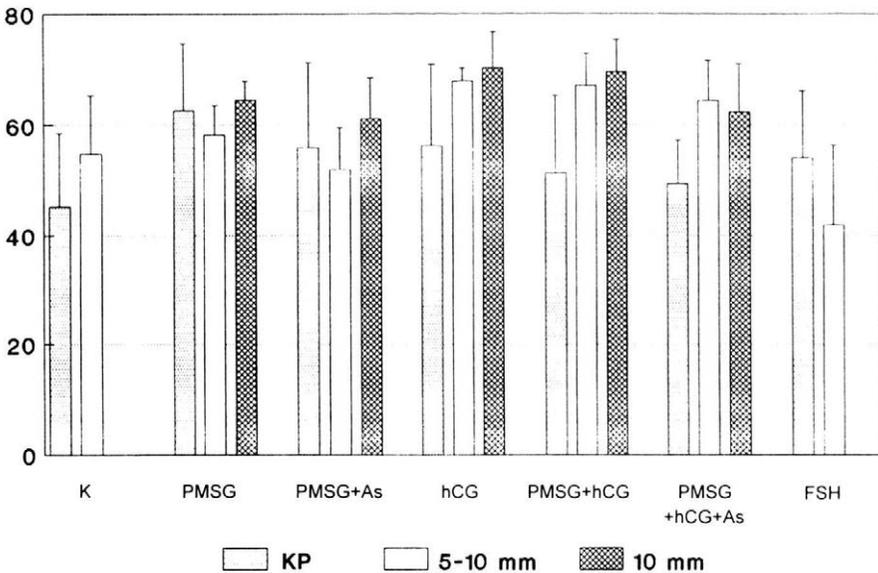
Skupina ¹	Krv ⁴	Folikuly ⁵					CL
		<5 mm	5–10 mm		>10 mm		
	TIA KP (%)	počty ⁶	počty	TIA FT (%)	počty	TIA FT (%)	počty
I. Kontrola ²	45,29 \pm 13,25	7,62 \pm 3,5	1,62 \pm 1,93	54,9 \pm 10,3	–	–	0,6 \pm 0,6
Intaktné	<i>n</i> = 52	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 8	–	<i>n</i> = 8
II. PMSG	62,62 \pm 12,1	6,62 \pm 5,3	0,37 \pm 0,9	58,3 \pm 5,3	0,37 \pm 0,7	64,37 \pm 3,5	2,66 \pm 1,9
1 000 IU	<i>n</i> = 37	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 25	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 8
III. PMSG + As	55,88 \pm 15,28	11 \pm 6,3	0,25 \pm 0,4	51,98 \pm 7,5	1,25 \pm 0,4	61,1 \pm 7,3	1,75 \pm 1,3
1 000 IU + 3 ml	<i>n</i> = 35	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 7	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 5	<i>n</i> = 4
IV. HCG	56,37 \pm 14,5	6,5 \pm 3,4	0,62 \pm 0,6	67,88 \pm 2,3	0,5 \pm 0,8	70,13 \pm 6,6	0,12 \pm 0,3
1 000 IU	<i>n</i> = 38	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 4	<i>n</i> = 8
V. PMSG + HCG	51,46 \pm 13,6	7,0 \pm 4,1	0,5 \pm 0,7	66,95 \pm 5,8	2,16 \pm 0,9	69,49 \pm 5,9	1,16 \pm 0,9
750 + 750 IU	<i>n</i> = 40	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 3	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 12	<i>n</i> = 6
VI. PMSG + HCG + As	49,52 \pm 7,79	3,6 \pm 4,7	0,87 \pm 1,2	64,24 \pm 7,3	1,37 \pm 0,8	62,3 \pm 8,7	2,0 \pm 2,12
750 + 750 IU + 5 ml	<i>n</i> = 41	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 6	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 11	<i>n</i> = 8
VII. FSH	54,16 \pm 11,9	2,8 \pm 4,6	9,25 \pm 4,6	41,91 \pm 14,4	–	–	1,25 \pm 3,5
400 IU, frakcionované ³	<i>n</i> = 47	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 8	<i>n</i> = 74	<i>n</i> = 8	–	<i>n</i> = 8

n = počty vyšetrených ovárií (folikulov) krvných vzoriek – counts of examined ovaries (follicles) of blood samples

¹group, ²control, ³fractionated, ⁴blood, ⁵follicles, ⁶counts



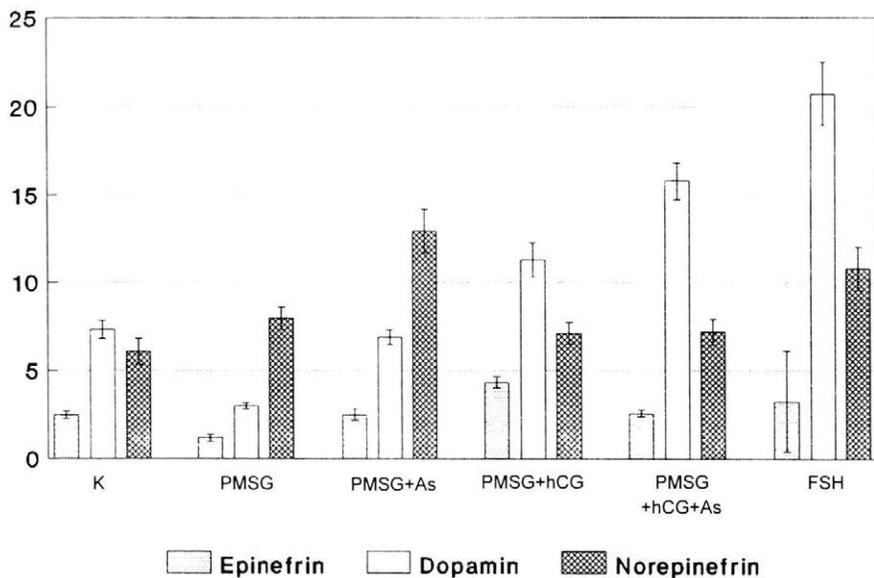
1. Priemerné počty prominujúcich folikulov a žltých teliesok na ováriam: os x = druh superovulačnej stimulácie, os y = priemerné počty folikulov kategórie do 5 mm, 5 až 10 mm a nad 10 mm – Average counts of prominant follicles and corpus luteum into ovarium: x axis = type of superovulation stimulation, y axis = average counts of follicles of the category to 5 mm, 5–10 mm and over 10 mm



2. Trypsin-inhibičné aktivity (TIA) krvnej plazmy (KP) a folikulárnej tekutiny folikulov kategórie 5 až 10 mm a nad 10 mm: os x = druh superovulačnej stimulácie, os y = TIA v % – Trypsin-inhibitory activities (TIA) of blood plasma (KP) and follicular fluid of follicles of the category 5–10 mm and over 10 mm; x axis = type of superovulation stimulation, y axis = TIA in %

značne individuálne ovulačné odpovede na superovulačnú stimuláciu (jedna ovca zo štyroch pokusných mala 10 ovulácií, ostatné žiadnu). Po superovulačnej stimulácii 400 IU FSH sa nevytvorili žiadne folikuly väčšie ako 10 mm.

Z dosiahnutých výsledkov stanovení katecholamínov vyplýva, že najnižšie priemerné koncentrácie dosahuje vo folikulárnej tekutine epinefrín (obr. 3). Koncentrácie dopamínu a norepinefrínu sa menili v závislosti od použitej superovulačnej stimulácie. Aplikácia PMSG spôsô-



3. Priemerné hodnoty epinefrínu, dopamínu a norepinefrínu vo folikulárnej tekutine; os x = druh superovulačnej stimulácie, os y = koncentrácie EPI, DA, NE v pmol/ml, v aritmetických priemeroch \pm S. E. M. – Average values of epinephrine, dopamine and norepinephrine in follicular fluid; x axis = type of superovulation stimulation, y axis = concentration of EPI, DA, NE in pmol/ml, in arithmetic means \pm S.E.M.

buje pokles hladín dopamínu (zo $7,321 \pm 0,520$ na $2,9 \pm 0,170$) vo folikulárnej tekutine ($p < 0,01$). Podobný trend je možné zaznamenať i u epinefrínu ($p < 0,05$). Hladiny norepinefrínu sa po podaní PMSG zvyšujú z $6,082 \pm 0,720$ na $7,954 \pm 0,628$ pmol/l. Po podaní PMSG a Antisergónu dochádza k vyrovnaniu hladiny epinefrínu a dopamínu na úroveň kontrolnej skupiny. Aplikácia hCG po PMSG má na hladiny katecholamínov vo folikulárnej tekutine odlišný účinok, hladiny katecholamínov sa v porovnaní s kontrolnou skupinou zvyšujú signifikantne u dopamínu ($p < 0,05$). Pôsobenie As po stimulácii PMSG + hCG signifikantne nemení hladiny epinefrínu a norepinefrínu, ale spôsobuje ich zvýšenie u dopamínu ($p < 0,05$). Po aplikácii FSH sme zaznamenali signifikantný vzostup ($p < 0,01$) hladiny dopamínu a norepinefrínu ($p < 0,01$) vo folikulárnej tekutine oviec, nesignifikantný vzostup sme pozorovali i v koncentráciách epinefrínu.

DISKUSIA

Proteolytické aktivity sa zúčastňujú na dejoch súvisiacich v ováriách s dozrievaním folikulov (Pellicer a i., 1988; Besnard a i., 1990; Spitzer a i., 1996), pri ovuláciách (Murdoch, 1985; Cajander, 1989; Tsafiri a i., 1989) a pri premene folikulárneho tkaniva na luteálne (Jones a i., 1988; Vassalli a i., 1991).

Proteázy serínového typu, akými sú plazmín a plazminogén aktivátor a ich inhibítory, sú syntetizované

a sekretované pod kontrolou gonadotropínov a spolu so steroidmi aj celým radom látok endokrinného, imunitného aj nervového systému. Zúčastňujú sa nielen pri ovuláciách, ale Knecht (1988) predpokladá ich účasť aj v skorších vývojových fázach ovariálnych folikulov. Gonadotropíny stimulujú enzymovú aktivitu tkanivového plazminogénového aktivátora (tPA) buniek granulózy krýs zvýšením bunkovej koncentrácie tPA mRNA (Ny a i., 1987), práve tak, ako modulujú aktivitu špecifického PA inhibítora (PAI) – Ny a i. (1985).

Zistenie vyšších hladín trypsin inhibičných aktivít (TIA) vo FT folikulov väčších ako 10 mm by mohlo naznačovať aj ich zvýšenú produkciu v čase 144 až 168 h po superovulačných stimuláciách, najmä po preparátoch s vyšším podielom LH zložky. Účinok zmeneného pomeru FSH : LH v preparátoch PMSG a hCG sa po následnom podaní antisergónu prejavil nielen odlišnými zmenami priemerných hodnôt TIA FT a KP a pomeru priemerných počtov folikulov 5 až 10 mm a väčších ako 10 mm, ale aj odlišnými zmenami priemerných hodnôt dopamínu a norepinefrínu. Plazminogén-plazmínový systém najnovšie je uznávaný ako zodpovedný za regulácie fyziologických situácií, akými sú fibrinolytický systém, ale aj migrácia buniek, prestavba a deštrukcia tkanív, implantácia embrya a ovulácie vrátane obratu extracelulárnej matrix a aktivácie latentných foriem niektorých rastových faktorov (Cajander a i., 1989; Vassalli a i., 1991).

Insulínu podobné rastové faktory (IGF) práve tak ako ich väzobné proteíny (IGFBP) sú produkované

ovariálnymi bunkami. Proteolýza uvoľňujúca tieto rastové faktory môže ich oddeľovať pre synergizmus s gonadotropínami, alebo limitovať biologickú inhibičnú aktivitu IGFBP-3. Toto pôsobenie má za následok stimuláciu folikulárneho dozrievania. U oviec je rast ovariálnych folikulov charakterizovaný zvyšovaním IGFBP-3 a znižovaním hladín intrafolikulárných a IGFBP menších ako 40 kDa (IGFBP-2,4,5). Naopak folikulárna atrezia súvisí so znižovaním IGFBP-3 a značným zvyšovaním hladín IGFBP menších ako 40 kDa. Besnard a i. (1996) aby zistili, či uvádzané zmeny sú spôsobované proteázami, inkubovali folikulárnu tekutinu (FT) z folikulov rôznej veľkosti a stupňa atrezie s ľudskými IGFBP-2,3,4 alebo 5. Zistili, že zmeny koncentrácií IGFBP počas rastu sú skutočne spôsobované čiastočne proteolýzou.

Podľa našich skorších zistení (Molnárová a i., 1991, 1992) sa inhibičné aktivity serínových proteáz (trypsín modelová serínová proteáza) v krvnej plazme oviec menia v priebehu ovariálneho cyklu prirodzeného aj po stimuláciách s superovuláciami a tieto zmeny sú ovplyvňované druhom použitých preparátov. Môžu ovplyvňovať proteolytické aktivity folikulárnej tekutiny najmä v predovulačnej fáze, kedy sa membrána folikulu stáva priepustnejšia aj pre makromolekuly krvnej plazmy (α_2 makroglobulín). Použitie preparátov s prevahou FSH zložky na stimuláciu ovárií prináša pozitívnejšie výsledky, avšak je prácnejšie, vyžaduje frakcionované podávanie. Jednorazové použitie sérových gonadotropínov (MSG) je z tohto hľadiska výhodnejšie, ale prináša niektoré problémy. Bouters a i. (1983) opisujú predĺžené príznaky ruje kráv po stimulácii MSG, ktoré autori tlmili podávaním anti-MSG séra. Odporučili podať toto antisérum približne 60 h po podaní PGF $_{2\alpha}$ (t. j. asi 12 h po začatí ruje). Neskoršie podanie malo menší efekt na skrátenie dĺžky ruje, skoršie znižovalo počty ovulácií. To podporuje naše zistenia, že podanie antisergónu 68 hodín po MSG nezvýšilo signifikantne počty ovulácií a navyše nezabránilo vytváraniu folikulov väčších ako 10 mm. Tieto folikuly mali vyššie priemerné trypsín inhibičné aktivity (TIA) ako prominujúce folikuly po stimulácii FSH (Molnárová a i., 1991).

Koncentrácia bielkovín vo folikulárnej tekutine (FT) bola nižšia oproti krvnej plazme (KP) kontrolných oviec ($p < 0,001$) a tvorila priemerne 62,72 % hodnôt. Stimulácia 1 000 IU MSG zvyšovala koncentráciu bielkovín vo FT ($p < 0,05$), čo znamenalo 85,03 % hodnôt KP. Antisergón podaný 68 h po MSG spôsobil ďalšie zvýšenie koncentrácie bielkovín vo FT ($p < 0,01$) a tie sa priblížili hodnotám v KP = 96,59 %. Podobnú situáciu sme zaznamenali po stimulácii MSG + hCG, kde zvýšenie vo FT bolo v priemere na 85,7 % hodnôt KP a Antisergón zvýšil hladinu významnosti na $p < 0,001$, čo znamenalo zvýšenie na 114,28 % hodnôt bielkovín KP (nepublikované výsledky). Tieto kvantitatívne, ale aj kvalitatívne, zmeny bielkovinového zloženia folikulárnej tekutiny môžu negatívne ovplyvňovať kvalitu ovčích oocytov, ako to opisujú Moor a i.

(1985). Zvýšená produkcia steroidov a najmä sekrecia estrogénov (E_2) po ošetrení MSG oproti FSH spôsobuje predčasnú aktiváciu jadrovej membrány oocyty, čo môže mať za následok zmenené zastúpenie proteínov v oocyte a sekrétoch pohlavného aparátu. Keďže bunky téky a granulózy funkčne kooperujú pri sekrécii E_2 do perifolikulárneho priestoru môžu zmeny sprevádzajúce atrezie folikulov, keď je morfológicky intaktná len vrstva téky, spôsobiť zmeny na E_2 závislého intrafolikulárneho regulačného mechanizmu (Zimmermann a i., 1989).

Oikawa a Hsueh (1989) vyslovujú možnosť parakrínnej úlohy β -adrenergických agensov na indukciu tkanivového typu plazmínogénového aktivátora (tPA) v bunkách granulózy krýs. Predpokladajú existenciu intraovariálneho adrenergického regulačného mechanizmu pre túto dôležitú proteázu, zúčastňujúcu sa v celom rade biologických procesov vyžadujúcich prestavbu pri raste tkanív spojenú s degradáciou intracelulárnej matrix. Úlohu ovariálnych catecholamínov v ováriách (CA) opísal čiastočne Al-Gubory a i. (1987.). Je možné predpokladať, že ovariálne CA sa podieľajú na vzostupe c-AMP a modulácii steroidogenézy (Bahr a Ben-Jonathan, 1981; Fernandez-Pardal a i., 1986), na zmene krvného toku v ováriách a maternici (Bahr a Ben-Jonathan, 1985) a na regulácii sekrecie progesteronu (Adashi a Hsueh, 1981). Fernandez-Pardal a i. (1986) predpokladajú, že norepinefrín je dominantným neurotransmiterom pre tvorbu žltého telieska. Viac norepinefrínu obsahuje theca interna, menej bunky granulózy a folikulárna tekutina (Al-Gubory a i., 1987). Norepinefrín počas estrálneho cyklu vykazuje v ováriách výrazne zmeny (Adashi a Hsueh, 1981). Veľmi nízke hladiny catecholamínov vo folikulárnej tekutine boli pozorované v skorom proestre potkanov (Bahr a Ben-Jonathan, 1981) a ošpaných (Fernandez-Pardal a i., 1986). Vychytávanie rádioaktívne značeného dopamínu (DA) a norepinefrínu (NE) a aktivita syntetizujúceho enzýmu dopamín- β -hydroxylázy bola nižšia v proestre než v diestre. Koncentrácie NE v preovulačných folikuloch ošpaných sú niekoľkonásobne vyššie ako v novovytvorenom žltom teliesku (Arbogast a i. 1987). Ovária sú schopné syntetizovať NE a DA v závislosti od aktivity tyrozín- β -hydroxylázy, enzýmu, ktorý predstavuje limitujúci faktor v biosyntéze catecholamínov. Predpokladá sa, že ovariálna steroidogenéza je kontrolovaná nielen hypofyzárnymi gonadotropínmi, ale aj adrenergickou ovariálnou inerváciou (Adashi a Hsueh, 1981).

V nám dostupnej literatúre je len málo údajov o vplyve superovulačných hormonálnych preparátov na hladiny folikulárných CA (Bahr a Ben-Jonathan, 1985; Bodis a i., 1983). Z našich výsledkov vyplýva, že účinok jednotlivých hormonálnych preparátov použitých v experimente na hladiny catecholamínov vo folikulárnej tekutine oviec je rozdielny. Signifikantné zníženie hladín DA ($p < 0,01$) a EPI ($p < 0,05$) sme pozorovali vo folikulárnej tekutine po podaní

PMSG. Norepinefrín nevykazoval po stimulácii PMSG výraznejšie zmeny. Anti-PMSG sérum (Antisergón) potlačuje hyperestrogenizáciu (Petra i., 1991) a čiastočne upravuje zníženú hladinu CA na úroveň kontrolných hodnôt. Po hormonálnej stimulácii PMSG a hCG, resp. uvedenou kombináciou s Antisergónom nedochádza k výraznejším zmenám CA vo folikulárnej tekutine oviec. Superovulačný preparát FSH výrazne zvyšuje hladiny DA ($p < 0,01$) a NE ($p < 0,001$) vo folikulárnej tekutine oviec. Výrazný vplyv na aktivitu monoamín-oxidázy, degradačného enzýmu (CA) v maternici oviec sme pozorovali po aplikácii FSH (Pástorová a Várady, 1994). Po podaní PMSG potkanom Arboogast a i. (1987) pozorovali dvojfázové zníženie syntézy CA, čo zdôvodňovali rastom folikulov a ovuláciou. Ben-Jonathan a i. (1985) zaznamenali signifikantný dvojfázový pokles ovariálnych CA po aplikácii PMSG. Podľa uvedených autorov mala na zmenu ovariálnych CA najvýraznejší účinok aplikácia FSH v porovnaní s inými preparátmi. Podobný účinok FSH na zmeny hladín CA i v krvnej plazme oviec sme opísali my v predchádzajúcich prácach (Pástorová a Várady, 1993). V centrálnych regulačných oblastiach reprodukcie oviec – v hypotalame (*area preoptica, eminentia mediana*) a v hypofýze sme naopak zaznamenali výraznejší vplyv PMSG oproti LH na zmeny koncentrácií catecholamínov (Pástorová a i., 1994). Neurosekrečné štruktúry z oblasti mediálneho hypotalamu (NARC) boli mierne stimulované k zvýšenej tvorbe neurosekrečného materiálu celulórného aj extracelulárneho po podaní hCG + PMSG, podanie Antisergónu po tejto kombinácii stimulácie mierne tlmiло (Staníková a i., 1991) Pri porovnaní účinkov FSH a PMSG na veľkosť objemu bunkových jadier v mediálnom hypotalame (NARC) (Staníková a i., 1989) pozorovali po podaní FSH zväčšenie týchto štruktúr, ale po podaní PMSG také výrazné zmeny nepozorovali. Toto mohlo byť spôsobené i pomalším odbúravaním sérových gonadotropínov v organizme v porovnaní s FSH, ktorého počas biologického rozpadu je krátky.

Podľa týchto aj našich zistení možno sa domnievať, že po superovulačných stimuláciách oviec nielen zmeny gonadotropných hormónov, ale aj zmenené koncentrácie inhibítorov serínových proteáz a catecholových amínov vo FT ovárií sú odrazom ich úloh pri regulácii dozrievania folikulov a ovulácií.

LITERATÚRA

ADASHI, E. Y. – HSUEH, J. W. (1981): Stimulation of β_2 -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cell *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, *108*, 2170–2178.

AL-GUBORY, K. M. – MARTINET, Y. – PALY, J. – SOLARIA, A. (1987): A new concept for follicular genesis during pregnancy of ewes. Role of corpus luteum. *Anim. Reprod. Sci.*, *15*, 113–120.

ARBOGAST, L. A. – GARRIS, A. – TODD, A. – RHOADE, A. – BEN-JONATHAN, N. (1987): Changes in ovarian norepinephrine synthesis throughout the follicular and luteal phase. *Physiol. Reprod.*, *36*, 889–906.

BAHR, J. M. – BEN-JONATHAN, N. (1981): Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology*, *108*, 1815–1819.

BAHR, J. M. – BEN-JONATHAN, N. (1985): Elevated catecholamines in porcine follicular fluid before ovulation. *Endocrinology*, *117*, 620–623.

BARTÍK, M. – CHAVKO, M. – KASAFÍREK, E. (1974): N-alpha-tosyl-p-nitroanilide as substrate in color test and polarographic test of trypsin. *Clin. Chim. Acta*, *56*, 23–30.

BESNARD, N. – PISSELET, C. – ZAPF, J. – HORNEBECK, W. – MONNIAUX, D. – MONGET, P. (1996): Proteolytic activity is involved in changes of intrafollicular insulin-like growth factor-binding protein levels during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*, *137*, 1599–1607.

BODIS, J. – HARTMANN, G. – TINNEBERG, H. R. – TOROK, A. – HANF, V. – PAPPENFUSS, F. – SCHWARZ, H. (1993): Relationship between the monoamine, progesterone and estradiol content in follicular fluid of preovulatory Graafian follicles after superovulation treatment. *Gynaecol. Obstet. Invest.*, *35*, 232–235.

BOUTERS, R. – MOYAERT, I. – CORYN, M. – VANDEP-LASSCHE, M. (1983): The use of a PMSG antiserum in superovulated cattle: Endocrinological changes and effects on timing of ovulation. *Zuchthygiene*, *18*, 172–177.

CAJANDER, S. B. (1989): Perioviulatory changes in the ovary. Morphology and expression of tissue-type plasminogen activator. *Develop. Ultrastruct. Reprod.*, 91–101.

FERNANDEZ-PARDAL, J. – GIMERA, W. P. – GIMERA, A. L. (1986): Catecholamine in sow Granian follicles at proestrus and at diestrus. *Physiol. Reprod.*, *34*, 439–445.

GOSDEN, R. G. – HUNTER, R. H. – TELFER, E. – TORRANCE, C. – BROWN, N. (1988): Physiological factors underlying the formation of ovarian follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, *82*, 813–825.

IMOEDEMHE, D. – SHAW, R. W. (1986): Follicular fluid alpha-1-antitrypsin correlation with fertilizing capacity of oocytes. *Brit. J. Obstet. Gyn.*, *93*, 863–868.

JONES, P. B. C. – MUSE, K. N. – WILSON, E. A. – CURRY, T. E. (1988): Expression of plasminogen activator (PA) and a PA inhibitor in human granulosa cells from preovulatory follicles. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, *67*, 857–860.

KHALID, M. – HARESIGN, W. (1996): Relationship between concentrations of ovarian steroids, insulin-like growth factor-I and IGF-binding proteins during follicular development in the ewe. *Anim. Reprod. Sci.*, *41*, 119–129.

KNECHT, M. (1988): Plasminogen activator is associated with the extracellular matrix of ovarian granulosa cells. *Molec. Cell. Endocrin.*, *56*, 1–9.

MOLNÁROVÁ, M. – ARENDARČÍK, J. – MÉSZÁROSOVÁ, T. (1991): Antiproteolytické aktivity krvnej plazmy a folikulárnej tekutiny ovárií oviec po stimulácii sérovým gonadotropínom (PMSG) a podaní Antisergónu. *Veter. Med. (Praha)*, *36*, 497–507.

- MOLNÁROVÁ, M. – ARENDARČIK, J. – MOLNÁR, P. (1992): Zmeny antiproteolytickej aktivity krvnej plazmy a cervikálneho hlienu po superovulatórnych stimuláciách. *Veter. Med. (Praha)*, *37*, 517–530.
- MONGET, P. – MONNIAUX, D. – PISSELET, C. – DURAND, P. (1993): Changes in insulin-like growth factor – I (IGF-I), IGF-II, and their binding proteins during growth and atresia of ovine ovarian follicles. *Endocrinology*, *132*, 1438–1446.
- MONGET, P. – BESNARD, N. – HUET, C. – PISSELET, C. – MONNIAUX, D. (1996): Insulin like growth factor-binding proteins and ovarian folliculogenesis. *Horm. Res.*, *45*, 211–217.
- MOOR, R. M. – OSBORN, J. C. – CROSBY, J. M. (1985): Gonadotropin induced abnormalities in sheep oocytes after superovulation. *J. Reprod. Fertil.*, *74*, 167–172.
- MURDOCH, W. J. (1985): Follicular determinants of ovulation in the ewe. *Domest. Anim. Endocrin.*, *2*(3), 105–121.
- NY, T. – BJERSING, L. – HSUEH, A. J. W. – LOSKUTOFF, D. J. (1985): Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology*, *116*, 1666–1668.
- NY, T. – LIU, Y. X. – OHLSSON, M. – JONES, P. B. C. – HSUEH, A. J. W. (1987): Regulation of tissue-type plasminogen activator activity and messenger RNA levels by gonadotropin-releasing hormone in cultured rat granulosa cells and cumulus-oocyte complexes. *J. Biol. Chem.*, *262*, 11790–11795.
- OIKAWA, M. – HSUEH, A. J. (1989): Adrenergic agents stimulate tissue plasminogen activator activity and messenger ribonucleic acid levels in cultured rat granulosa cells. *Endocrinology*, *125*, 2550–2557.
- PÁSTOROVÁ, B. – VÁRADY, J. (1993): The effect of hormonal superovulatory preparation on the changes in monoamine oxidase activity in the uterus of sheep. *Folia Vet.*, *37*, 45–48.
- PÁSTOROVÁ, B. – VÁRADY, J. (1994): The influence of PMSG and Antiseron on monoamine oxidase activity in some hypothalamic-hypophyseary structures and in the epiphysis of sheep in the estrous period. *Folia Vet.*, *38*, 35–39.
- PÁSTOROVÁ, B. – STANÍKOVÁ, A. – RAJTOVÁ, V. – VÁRADY, J. (1994): Changes in some biochemical and histological characteristics in the hypothalamus of hormonally stimulated sheep. *Int. J. Anim. Sci.*, *9*, 1–8.
- PELLICER, A. – LIGHTMAN, A. – ARIZA, A. – DeCHERNEY, A. – NAFTOLIN, F. – LITTLEFIELD, A. (1988): Follicular development is impaired by inhibitors of serine proteases in the rat. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, *158*, 670–676.
- REICH, R. – MISKIN, R. – TSAFRIRI, A. (1986): Intrafollicular distribution of plasminogen activators and their hormonal regulation *in vitro*. *Endocrinology*, *119*, 1588–1601.
- ROM, E. – REICH, R. – LAUFER, N. – LEWIN, A. – RABINOWITZ, R. – PEVSNER, B. – LANCET, M. – SHENKER, J. G. – MISKIN, R. – ADELMANN-GRILL, B. C. – TSAFRIRI, A. (1987): Follicular fluid contents as predictors of success of *in vitro* fertilization – embryo transfer. *Hum. Reprod.*, *2*, 505–510.
- SMOKOVITIS, A. – KOKOLIS, N. – ALEXAKI-TSIVANIDOU, E. (1988): The plasminogen activator activity is markedly increased mainly at the area of the rupture of the follicular wall at the time of ovulation. *Anim. Reprod. Sci.*, *16*, 285–294.
- SPITZER, D. – MURACH, K. F. – LOTTSPREICH, F. – STAUDACH, A. – ILLMENSEE, K. (1996): Different protein patterns derived from follicular fluid of mature and immature human follicles. *Hum. Reprod.*, *11*, 798–807.
- STANÍKOVÁ, A. – ARENDARČIK, J. – PÁSTOROVÁ, B. (1989): Morfológické a biochemické zmeny v hypotalame u hormonálne stimulovaných oviec. *Veter. Med. (Praha)*, *34*, 39–50.
- STANÍKOVÁ, A. – RAJTOVÁ, V. – ARENDARČIK, J. (1991): Zmeny v hypotalame a príľahom ependýme bahnič po hormonálnej stimulácii ovárií. *Veter. Med. (Praha)*, *36*, 107–117.
- TSAFRIRI, A. – BICSAK, T. A. – CAJANDER, S. B. – NY, T. – HSUEH, A. J. W. (1989): Suppression of ovulation rate by antibodies to tissue type plasminogen activator and α_2 antiplasmin. *Endocrinology*, *124*, 415–421.
- VASSALLI, J. D. – SAPPINO, A. P. – BELIN, D. (1991): The plasminogen activator plasmin system. *J. Clin. Invest.*, *88*, 1067–1072.
- YAMADA, M. – GENTRY, P. A. (1995): Hemostatic profile of bovine ovarian follicular fluid. *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, *73*, 624–629.
- YAMADA, M. – HOIRUCHI, T. – ORIBE, T. – YAMAHO TO, S. – MATSUSHITA, H. – GENTRY, P. A. (1996): Plasminogen activator activity in the bovine oocyte-cumulus complex and early embryo. *J. Vet. Med. Sci.*, *58*, 317–322.
- ZIMMERMANN, R. C. – WESTHOF, G. – HOEDEMAEKER, M. – GRUNERT, E. – BRAENDLE, W. (1989): Is follicular fluid content representative of follicular steroid secretion? *Anim. Reprod.*, *4*, 29–32.

Received: 97-04-18

Accepted after corrections: 97-07-31

Kontaktná adresa:

Doc. Ing. Mária Molnárová, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 21 11–15, fax 095/632 36 66

LAMB FATTENING AND CARCASS CHARACTERISTICS OF CROATIAN CROSSBRED DAIRY SHEEP

VÝKRM JEHNĀT A JATEČNĀ HODNOTA KŘÍŽENCŮ MLĚČNÝCH OVCÍ v CHORVATSKU

K. Mikulec¹, V. Sušić¹, V. Šerman², Ž. Mikulec², R. Pipić¹, T. Balenović¹, D. Matičić³

¹ Department of Animal Breeding and Husbandry, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Croatia

² Department of Animal Nutrition, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Croatia

³ Clinic of Surgery, Orthopedy and Ophthalmology, Veterinary Faculty, University of Zagreb, Croatia

ABSTRACT: In the Mediterranean region of the Republic of Croatia, a programme of genetic creation of domestic dairy sheep has been carried out. The programme was based on three breeds: autochthonous Istrian Pramenka (IP) and imported Sardinian (S), as well as East Friesian (EF) breeds. In this paper fattening and slaughter characteristics of lambs, crossbreds of the breeds mentioned, have been investigated. The aim was to check the possibilities of new sheep type in production of meat which is after milk a secondary product. For the sake of comparison a meat-wool German Domestic Merino breed (GDM) was also introduced in the investigation. In total 40 male lambs were included in the trial. They were weaned at the age of 36 days and after that fattening period followed until the age of 71 days when the lambs were slaughtered. The IPS x EF and IPS x GDM crossbred lambs manifested approximately similar level of average daily weight gain (297 g and 299 g, respectively) being statistically significantly higher ($P < 0.05$) compared to the level of the same characteristic in lambs of IPS x S genotype. During fattening period the lambs of the first two genotypes manifested also a lower NU (nutrition units) consumption for 1 kg of weight gain. At the same time it was established that fattening, based exclusively on the nutrition with concentrate and hay, should not be carried out longer than average age of lambs of 60 days. Slaughter efficiency as well as most of the measures of body development were in the lambs with IPS x EF and IPS x GDM genotypes about equal and generally on the higher level compared to the lambs with IPS x S genotype. The established indicate the justification of using of the East Friesian breed (EF), which in the programme of genetic creation of dairy sheep, should contribute not only to increase the milking capacity but also to meat production as a secondary product.

sheep; crossbreeding; lamb-fattening; carcass

ABSTRAKT: Ve středomořské oblasti Chorvatské republiky byl uskutečněn program křížení tří plemen ovcí mléčného typu: místního plemene istrijské Pramenky (IP), dovezené ovce sardinské (S) a ovce východofrišské (EF). Pro srovnání byly v programu použity i ovce plemene německé domácí merino (GDM) s užitkovostí maso-vlna. U kříženců uvedených plemen byly sledovány ukazatele užitkovosti a jatečné hodnoty s cílem otestovat schopnosti nových typů ovce v masné produkci. Do pokusu bylo zařazeno 40 beránků. Jehňata byla odstavena ve věku 36 dní a po zařazení do výkrmu poražena ve věku 71 dní. Kříženci IPS x EF a IPS x GDM vykazovali stejný průměrný denní přírůstek hmotnosti (297, resp. 299 g), který však byl statisticky významně vyšší ($P < 0,05$) než u kříženců IPS x S. Těchto vyšších přírůstků hmotnosti bylo dosaženo při nižší spotřebě živin (NU/kg přírůstku) než u genotypu IPS x S. Výkrm jehňat s použitím jadrného krmiva a sena by měl být ukončen do dosažení průměrného věku 60 dnů. Zapojení plemene EF do programu genetické tvorby mléčných ovcí může zřejmě přispět ke zvýšení jak mléčnosti, tak produkce masa.

ovce; křížení; výkrm jehňat; jatečné tělo

INTRODUCTION

Having an objective to create a domestic sheep of dairy type for Mediterranean region of the Republic of Croatia (Mikulec et al. 1992, 1996), a breeding programme has been carried out based on autochthonous

sheep – the breed of Istrian Pramenka (IP) and rams of the imported dairy breeds – Sardinian (S) and East Friesian (EF). Until now sheep – crossbreds of F₂ generation (IP x S) have been bred with participation of 25% of the genome of Istrian Pramenka and 75% of the genome of Sardinian breed. They have been mated with

rams of East Friesian breed in order to produce the sheep – triple breed crossbreeds (IPS x EF) – intended for milk production.

In estimating the economic effects of various crossbreeds developed during the creation of future sheep type, beside the milk production, the production of lamb meat occupies a significant position. Traditionally, the sheep – breeders of this area use to keep a lamb with a ewe for about 60 days and then the lambs are separated and sold for slaughtering (weighing between 15 and 18 kg). After that sheep are milked for the following three to four months. In order to increase the quantity of milked milk earlier weaning is more often practised (Šerčan et al., 1992). By introducing the feedstuffs in lambs' nutrition the traditional routine of sheep-breeders changes and lambs are fattened to higher weights (from 20 to 25 kg). Justification of such procedures can be estimated only by scientific verification of the particular factors important for the lambs fattening and slaughter efficiency. Among those the most important are: genetic capacity of the various crossbreeds for weight gain, feed conversion, carcass conformation and live : dead body ratio.

The level of those indicators has been reported for many, mostly, specialized meat or combined meat-wool sheep breeds. Comparatively fewer number of the quotations relates to dairy breeds and their crossbreeds, respectively – Živković et al. (1981), Güney and Biçer (1986), Alkass et al. (1987), Margetin et al. (1993), Paulina et al. (1996), Zygoyiannis et al. (1996), Hadjipanayiotou et al. (1996).

Considering the above-mentioned studies, in this work we wanted to investigate weight gain and feed conversion as well as carcass measures and slaughter efficiency of the three dairy (IP, S, and EF) crossbred genotypes. Beside that, we were interested in possible crossbreeding effect by introducing a specific meat-wool breed (German Domestic Merino – GDM) whose rams could be used, in combine programme, for increasing the lamb meat production of the future milk-type sheep.

MATERIAL AND METHODS*

For producing the experimental lambs, mothers of the same genotype – crossbreeds of F₂ generation between the sheep of Istrian Pramenka and the rams of Sardinian breed (IP x S) – were used. During the autumn mating season in 1995, they were divided into three groups. A ram of Sardinian breed (S) was assigned to the first group, a ram of East Friesian breed (EF) to the second group and a ram of a German Domestic Merino breed (GDM) to the third group. In this way three experimental groups of lambs differing according to the genotype were isolated at lambing: IPS

x S (n = 13), IPS x EF (n = 13) and IPS x GDM (n = 14).

Only the lambs of male sex, from the single litter and not differing in the date of birth for more than five days were included in the investigation.

The suckling period of the lambs lasted till the average age of 36 days. Starting from the 14th day of life, beside the mothers' milk, the lambs were also given the concentrate composed of maize, soybean grits, fodder meal, fish meal and premix (vitamin-mineral mixture for the lambs). For the food mineral analyses "The Analytical Methods for Atomic Absorption Spectrophotometry" (Perkin Elmer-1982-) was used. Dry matter, ashes, crude proteins, crude fat and crude fibres were determined by the standard Wende method.

The chemical composition of the concentrate is in Tab. I.

Hay of lucerne was given ad libitum, and its chemical composition and energy value is in Tab. II.

I. Chemical composition and energy value of the concentrate for feeding and fattening the lambs

Chemical composition	%
Dry matter	90.0
Crude proteins	18.02
Crude fat	3.53
Crude fibres	3.89
Ashes	5.63
Ca	0.86
P (total)	0.63
Na	0.25
E (NU/kg)*	1.24

* Oaten nutritive unit

On the weaning day a body mass of each lamb was recorded. Also from the mother-sheep the quantity of

II. Chemical composition and energy value of hay of lucerne for feeding and fattening the lambs

Chemical composition	%
Dry matter	86.0
Crude proteins	14.0
Crude fibres	23.0
Ca	1.46
P	0.20
E (NU/kg)	0.46

milked milk was established by a milking machine. During the fattening period the lambs were housed according to the genotype in three separated pens. In each pen there were feeders for concentrate and hay and drinkers with water.

*Units of energetic value used in the paper do not comply with the system of feed assessment used currently in the Czech Republic.

The fattening period lasted 35 days, thus on the day of slaughtering the lambs were at the average age of 71 days. During that time for each lamb the increase of the body mass was measured in the intervals of seven days. Also, on the day of lambs' weighing, the consumption of the concentrate consumed for the past seven days period was established. In the total calculation of the feed consumed also the consumption of averagely 1 kg of hay for 1 kg of weight gain was also taken into consideration. This was based on the quantity of the total consumed hay during the whole pre-weaning and fattening period.

On the day of slaughtering lambs' live body mass was established. Immediately after carrying out the slaughtering process, also the warm body mass and the mass of skin together with fleece was performed. On the bodies of the slaughtered lambs the following body measures were taken: the body length I (from the first cervical vertebrae to the tuber ischii), the body length II (from the first rib to the tuber ischii), the leg length (from the hip to the place of cutting the distal part of the extremity), the leg volume (on the widest part) and the chest volume (behind the shoulder-blade on the narrowest part).

The statistical significance of the differences noted for particular characteristics among the lambs with different genotypes was tested by a One-Way Analysis of Variance (Statgraphics-statistical graphics system-version 4.0).

RESULTS AND DISCUSSION

Weight gain and feed consumption for a kilogram of weight gain

The lambs' average body mass and the feed consumption for kg of weight gain during fattening period are shown in Tab. III.

The birth masses of all three lamb genotypes varied in a relatively narrow range from 4.24 kg (IPS x S) to 4.42 kg (IPS x GDM). In comparison to the data of 3.0 kg that was established for the same characteristic in thoroughbred Istrian breed by R a k o (1957), a relatively large increase of the lambs' birth mass can be noticed. This has a positive impact not only to a higher lambs' surviving rate and their further growth, but also to the milking capacity of their mothers (P a u l i n a et al. 1996).

At the time of weaning (36th day), lambs with genotypes IPS x EF and IPS x GDM manifested approximately the same body mass (16.39 and 16.65 kg) being statistically significantly ($P < 0.01$) higher than the body mass of lambs with genotype IPS x S (13.99 kg). In that period the lambs with the first two genotypes obtained an absolute gain of 12.07 and 12.23 kg, respectively or 23–25% higher as compared to the gain of lambs with IPS x S genotype. Trying to investigate whether the lambs' higher gain could be explained by

larger quantity of suckled milk, on the day of weaning we have controlled their mother's daily milking capacity. According to that the consumption of milk for 1 kg of gain was calculated in regard to a daily weight gain. The results are shown in Tab. IV.

In the suckling period the lambs with IPS x EF and IPS x GDM genotypes achieved the average daily gain of 345 and 349 grams respectively, or 66 to 70 grams more in comparison with the lambs with IPS x S genotype. This is a statistically significantly ($P < 0.01$) higher gain for about 25% which, considering the relatively small differences in the quantity of suckled milk, could be explained by better capacity for growth and feed efficiency. More certain proof for the stated should be verified by measuring the quantity of the consumed concentrate and hay which the lambs consumed together with mothers' milk from the 14th day of age.

The similar relations between genotypes were established also during the period of fattening (Tab. III). At the beginning of fattening (36th day) the lambs with IPS x EF and IPS x GDM genotypes had approximately the same body mass of 16.39 and 16.65 kg, respectively. At the end of fattening (71st day) the very same lambs obtained the mass of 25.43 and 25.66 kg, respectively, which means that in 35 days of fattening they obtained an absolute weight gain of 9.04 and 9.01 kg, respectively. In the same period the lambs with IPS x S genotype obtained statistically significantly ($P < 0.05$) lower absolute gain of 7.75 kg, since they had started fattening with the mass of 13.99 kg and ended it with 21.74 kg.

The average daily weight gain of the lambs for the period of suckling, fattening and for the whole period from birth till the end of fattening is shown in Tab. V.

During the suckling period the lambs obtained from 26% (IPS x S) to about 35% (IPS x EF and IPS x GDM) higher average daily weight gain as compared to fattening period.

In both periods as in total, the lambs of (EF) and (GDM) fathers manifested statistically significantly ($P < 0.05$) higher daily gain as compared to the lambs of (S) father. The difference during suckling was about 25%, during fattening about 16% and for the whole investigated period about 21%, respectively.

The dynamics of gain and feed consumption in the fattening period was monitored in the intervals of seven days. As it is shown in Table III and in Figures 1 and 2, the lambs of all three genotypes manifested the increase of gain and feed consumption till the third week of fattening (50–57 days of age). After that the weight gain manifested decrease while feed consumption for 1 kg of gain showed an abrupt increase, particularly in the last week. Regardless the specificities in the particular genotypes, as for example in IPS x EF lambs which manifested the highest gain and lowest feed consumption during the largest period of fattening, a general conclusion imposes that fattening should be temporally limited till the average age of about 60 days.

III. Body mass and feed consumption for 1 kg of weight gain during fattening period

Age	Indicator		Lamb genotype		
			IPS x S (n = 13)	IPS x EF (n = 13)	IPS x GDM (n = 14)
1st day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 4.24$ $s = 0.70$	$\bar{x} = 4.32$ $s = 0.75$	$\bar{x} = 4.42$ $s = 0.47$
36th day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 13.99$ $s = 2.01$	$\bar{x} = 16.39^{**}$ $s = 2.70$	$\bar{x} = 16.65^{**}$ $s = 1.93$
43rd day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 15.16$ $s = 2.23$	$\bar{x} = 17.65^{**}$ $s = 3.17$	$\bar{x} = 18.34^{**}$ $s = 2.51$
36–43th day	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	1.45	1.62	1.04
		N. u.	2.27	2.49	1.76
		Crude proteins (g)	401	432	327
50th day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 16.91$ $s = 2.61$	$\bar{x} = 19.92^{**}$ $s = 3.39$	$\bar{x} = 20.41^{**}$ $s = 2.84$
43–50th day	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	2.11	1.51	1.72
		N. u.	3.10	2.35	2.61
		Crude proteins (g)	520	412	450
57th day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 19.13$ $s = 2.86$	$\bar{x} = 22.36^*$ $s = 3.47$	$\bar{x} = 22.69^*$ $s = 3.21$
50–57th day	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	2.34	2.22	2.15
		N. u.	3.39	3.24	3.15
		Crude proteins (g)	561	540	527
64th day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 20.83$ $s = 3.00$	$\bar{x} = 24.44^*$ $s = 3.80$	$\bar{x} = 24.73^*$ $s = 3.61$
57–64th day	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	2.30	1.84	1.63
		N. u.	3.34	2.76	2.50
		Crude proteins (g)	554	471	433
71st day	Body mass (kg)		$\bar{x} = 21.74$ $s = 3.08$	$\bar{x} = 25.43^*$ $s = 3.76$	$\bar{x} = 25.66^*$ $s = 3.62$
64–71st day	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	4.03	3.33	3.63
		N. u.	5.50	4.62	5.00
		Crude proteins (g)	865	739	793
On an average for the whole fattening	Consumed for 1 kg of weight gain	Concentrate (kg)	2.34	1.99	1.88
		N. u.	3.39	2.95	2.81
		Crude proteins (g)	561	498	478

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; \bar{x} = mean; s = standard deviation

IV. Milking capacity of mothers, quantity of suckled milk and milk consumption for 1 kg of weight gain of lambs until weaning

Indicator		Lamb genotype		
		IPS x S	IPS x EF	IPS x GDM
Daily milking capacity of mothers	(l)	$\bar{x} = 1.92$ $s = 0.34$	$\bar{x} = 2.06$ $s = 0.23$	$\bar{x} = 1.98$ $s = 0.36$
Suckled milk in total	(l)	67.2	72.1	69.3
Average daily gain	(g)	$\bar{x} = 279$ $s = 40.2$	$\bar{x} = 345^{**}$ $s = 56.9$	$\bar{x} = 349^{**}$ $s = 40.5$
Milk consumption (l) for kg of gain		6.9	6.0	5.7

** $P \leq 0.01$

This applies to the specific conditions of fattening with concentrate and hay. Possible extending of fattening period should be checked, especially on the basis of pasture utilization in lambs' feeding.

Lambs' carcass measures and slaughter efficiency

After carrying out the slaughtery process by which skin with fleece, internal organs (except kidneys) and

V. Average daily gain (g) of lambs with different genotypes

Period	Lamb genotype		
	IPS x S	IPS x EF	IPS x GDM
Suckling (1-35th day)	279	345	349
Fattening (36-71st day)	221	258	257
Total (1-71st day)	246	297	299

VI. Rendement and development of particular parts of the bodies of the lambs slaughtered

Indicator		Lamb genotype		
		IPS x S	IPS x EF	IPS x GDM
Rendement	(%)	52.6	53.7	55.0
Weight of skin and fleece	(kg)	2.5	2.8	3.0
Body length I	(cm)	78.7	82.7	82.8
Body length II	(cm)	66.8	65.0	69.3
Chest volume	(cm)	62.5	61.2	62.0
Leg length	(cm)	45.2	47.7	48.3
Leg volume	(cm)	35.3	36.3	38.3

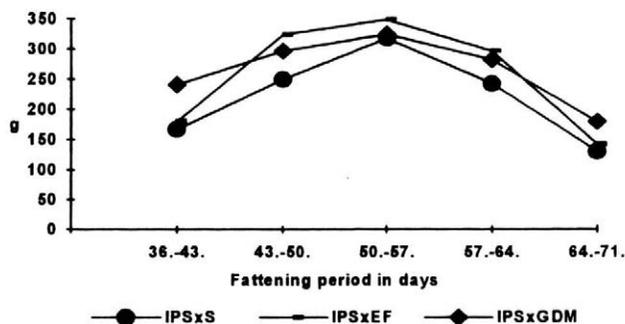
distal parts of the extremities (from hock downwards) were removed, some carcass measures were taken and slaughtery efficiency calculated.

From the results showed in Tab. VI and from the Fig. 3, it can be seen that the carcasses of the lambs with IPS x EF and IPS x GDM genotypes were generally better developed as compared to carcasses of IPS x S lambs.

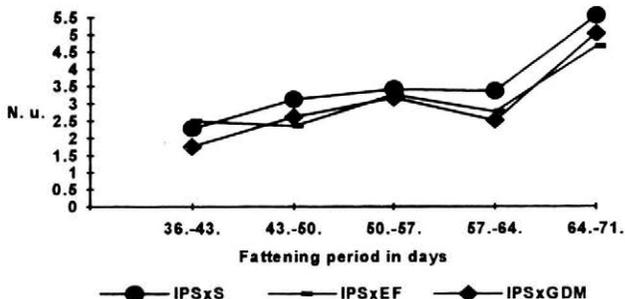
Here stood out the positive influence of the fathers of GDM breed, whose lambs dominated by the markedness of their body length I (4.1 cm or for about 5% longer as compared to IPS x S) and body length II (4.3 cm or for about 7% longer as compared to IPS x EF). In the lambs of that genotype the measures of legs were also the most prominent. Averagely, they exceeded for about 3 cm (7-8%) the markedness of the same measures in IPS x S lambs. Relatively the smallest differences among the genotypes showed the measures of chest volume varying in the range from 61.2 (IPS x EF) to 62.5 cm (IPS x S).

By the level of markedness, slaughtery efficiency showed the same relations among the genotypes. The genotype IPS x GDM dominated with 55.0%, being 2.4% more as compared to the same indicator established in the lambs with IPS x S genotype. Despite the limited number of investigations which could be used for comparing our results, it can be stated that the values of slaughtery efficiency are generally rather high. This is supported by the quotations of Živković et al. (1981) who found the slaughtery efficiency of 43-44% for the most strains of Croatian sheep breeds.

However, the results of this investigation should be considered in the scope of genetic creation of Croatian dairy sheep. We wanted to check the properties of male lambs developed on the current stage of crossbreeding between autochthonous Istrian Pramenka with the Sardinian and East Friesian rams, respectively. At the same time, beside these two dairy breeds, the ram of German meat-wool type was introduced for compari-



1. Average daily gain of lambs during fattening period



2. Nutritive units consumption for 1 kg of gain of lambs during fattening period



3. Lamb carcass from three different genotypes (from left to right: IPS x S, IPS x GDM and IPS x EF)

son. Although this breed is not in breeding program for dairy sheep we wanted to investigate its influence on lambs' fattening abilities and slaughtering efficiency. If this influence is positive, German Domestic Merino breed, which is primarily imported for improving meat and wool productivity of sheep raised in continental part of Croatia, could be used for improving meat productivity in populations of milk sheep. This is meant only for commercial (not breeding) sheep whose lambs are in 100% raised for slaughtering.

The results obtained for three compared breeds give the priority to East Friesian breed. The male progeny of this breed obtained significantly better results as compared to the progeny of the parallel dairy breed (Sardinian) and approximately the same results as compared to the progeny of a meat-wool breed (GDM).

This justifies the usage of this breed in the genetic creation of domestic dairy sheep from which, beside milk, a high yields of meat as a secondary product could also be expected.

REFERENCES

- ALKASS, J. E. – TAHIR, M. A. – ALRAWI, A. A. – BADAWEI, F. S. (1987): Performance of crossbred lambs raised under two different feeding regimes. *Wld Rev. Anim. Product.*, 23, 21–25.
- GÜNEY, O. – BIÇER, O. (1986): The fattening performance and carcass characteristics of Awassi x Awassi, Ile de France x Awassi (F₁) and Chios x Awassi first back cross (B₁) ram lambs. *Wld Rev. Anim. Product.*, 22, 63–67.
- HADJIPANAYIOTOU, M. – KOUMAS, A. – HADJIGAVRIEL, G. – ANTONIOU, I. – PHOTIOU, A. – THEODORIDOU, M. (1996): Feeding dairy ewes and goats and growing lambs and kids on mixtures of protein supplements. *Small Ruminant Research*, 21, 203–211.
- MARGETIN, M. – ČAPISTRAK, A. – KALIŠ, M. (1993): Milk production of Tsigai ewes and crosses with East Friesian breed in connection with weight of their lambs during raising. *J. Farm Anim. Sci.*, 26, 181–188.
- MIKULEC, K. – ŠERMAN, V. – SUŠIĆ, V. (1992): Revival and improvement of sheep and goat production in the Republic of Croatia. *Krmiva*, 34, 155–160.
- MIKULEC, K. – SUŠIĆ, V. – PIPIC, R. (1996): Breeding objectives and breeds important for improving sheep breeding in the Republic of Croatia. *Vet. Stanica*, 27, 9–16.
- PAULINA, G. – BENCINI, R. – RASSU, S. P. G. (1996): Relation between birth weight of lambs and milk production in ewes. *Stočarstvo*, 50, 199–203.
- RAKO, A. (1957): Mouton laitier d'Istrie. *Stočarstvo*, 9–10, 1957: 423–429.
- ŠERMAN, V. – MIKULEC, K. – SUŠIĆ, V. – MATIČIĆ, D. – MAS, N. (1992): Possibility of earlier lamb weaning among bigger agglomerations of dairy sheep. *Krmiva*, 34, 89–92.
- ZYGOYIANNIS, D. – STAMATARIS, C. – DONEY, J. (1996): Options for the production of lamb carcasses from Greek dairy breeds of sheep: I. indoor feeding. *Stočarstvo*, 50, 23–26.
- ZIVKOVIĆ, J. – MIKULEC, K. – MARKOVIĆ, J. – ARAMBAŠIĆ, V. – PETRAK, T. (1981): Regarding meat of Pramenka sheep and her crossbreds. *Stočarstvo*, 35, 21–30.

Received: 97-03-04

Accepted after corrections: 97-07-28

Contact Address:

Prof. dr. sc. Kreimir Mikulec, Zavod za stočarstvo, Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Heinzelova 55, 10 000 Zagreb, Croatia

Tel. 385/1/239 02 21, fax 385/1/21 46 97

LYMPHOCYTIC THYROIDITIS IN BEAGLE DOGS IN A BREEDING COLONY: FINDINGS OF SERUM AUTOANTIBODIES

LYMFOCYTÁRNÍ THYREOIDITIS PSŮ PLEMENE BEAGLE V CHOVNÉ KOLONII: NÁLEZY SÉROVÝCH AUTOPROTILÁTEK

L. Vajner

Institute of Histology and Embryology, 2nd Faculty of Medicine, Charles University, Praha, Czech Republic

ABSTRACT: Three serum autoantibodies against antigens of the thyroid gland were detected by the indirect immunofluorescence in a Beagle dog breeding colony. The anti-thyroglobulin autoantibody was present in 10.0%, the anti-microsomal antigen autoantibody was present in 24.6%, and the anti-nuclear substance autoantibody in 10.8% of examined sera, respectively. Only the presence of anti-thyroglobulin autoantibodies could be correlated with histologic findings of the lymphocytic thyroiditis in the same colony.

lymphocytic thyroiditis; serum autoantibodies; indirect immunofluorescence; Beagle dog

ABSTRAKT: V chovné kolonii psů plemene beagle byl metodou nepřímé fluorescence zjištěn výskyt tří sérových autoprotílátek proti antigenům štítné žlázy. Protílátka proti thyreoglobulinu byla nalezena u 10,0 %, protílátka proti mikrosomálnímu antigenu byla zjištěna u 24,6 % a protílátka proti jaderné substanci u 10,8 % vyšetřených sér. Do souvislosti s histologickým nálezem lymfocytární thyreoiditidy ve stejné chovné kolonii lze uvést pouze nález sérové autoprotílátky proti thyreoglobulinu.

lymfocytární thyreoiditis; sérové autoprotílátky; nepřímá imunofluorescence; pes beagle

INTRODUCTION

The methods of diagnosing the serum autoantibody in lymphocytic thyroiditis (LT) of dogs were studied by Mizewski et al. (1971). Together with immunological methods, they also used the method of indirect immunofluorescence. Nožička (1991) introduced the term „histoserology“ for such a method. This method was the only to reveal all the antibodies simultaneously. In the study by Mizewski et al. (1971), it was possible to reveal the presence of serum antibodies against both the thyroglobulin (TgAb) and the microsomal antigen (MiAb, thyroidal peroxidase TPOAb), and the anti-second colloidal antigen antibody (CA-2Ab). The presence of TgAb was manifested within follicles as a „cracked mirror“ fluorescent pattern, CA-2Ab evidenced as a diffuse fluorescence. Gosselin et al. (1982) substantiated the previous findings by identifying circulating autoantibodies using various immunological methods.

Wetman (1990) described that human thyroglobulin (Tg) and thyroidal peroxidase (TPO) share a common epitope. On the other hand, Ruf et al. (1994) revealed the bispecific autoantibody against both Tg and TPO occurred in patients with Hashimoto's thyroiditis. McLachlan et al. (1990) studying the pathogenesis of LT implied that the autoantibodies against TPO play a crucial role in man, but only a minor role in animals.

In dogs this fact was confirmed by Thacker et al. (1995). These authors gave evidence that the serum anti-TPO autoantibodies occurred independent of LT occurrence in dogs.

MATERIAL AND METHODS

Numbers of autopsied and histopathologically examined and/or histoserologically examined young and adult animals from a semi-closed Beagle dog breeding colony are presented in Tab. I. This group is the same as described in our previous study (Vajner et al., 1997).

Since period B, the blood sera of autopsied dogs were collected for the immunofluorescence examination. Each sample was taken from the last collection before euthanasia. The sera of dogs which had died spontaneously were not taken post mortem. Before the immunofluorescence examination, each sample was stored frozen at -30°C in a glass test tube with a rubber plug at least for one month.

During period B, serum samples were obtained occasionally from 48.4% of the autopsied animals (49.2% of males, 47.8% of females). Thus this period served for a preliminary study only.

During period C, we collected serum samples from 94.5% of autopsied animals (93.8% of males, 95.2% of females).

	Histopathologically examined			Sera examined		
	Total	Males	Females	Total	Males	Females
Total A + B + C (18 years)	2 238	1 079	1 159	–	–	–
Period A (11 years)	1 294	640	654	0	0	0
Period B (5 years)	669	309	360	324	152	172
Period C (2 years)	275	130	145	260	122	138
Subtotal B + C (7 years)	944	439	505	584	274	310

The immunohistological evidence of autoantibodies found in the examined sera was carried out using the standard two-step immunofluorescence method (Nožička, 1991). As the source of tissue antigens, we used 4 µm thick cryostat (Minotome Damon) sections from the canine thyroid gland. For the second step of the reaction, we used a porcine anti-canine globuline (SwADog) obtained from the Department of Microbiology of the Research Institute for Pharmacy and Biochemistry at Rosice nad Labem, conjugated with fluorescein-isothiocyanate (FITC). The testing and conjugation was done by the Institute of Sera and Vaccines (SEVAC) in Prague. The quality of the fluorescence intensity was evaluated (0 = negative, + = positive) using a fluorescence microscope. The quantity was classified only by conventional means as +, ++, or +++ degrees.

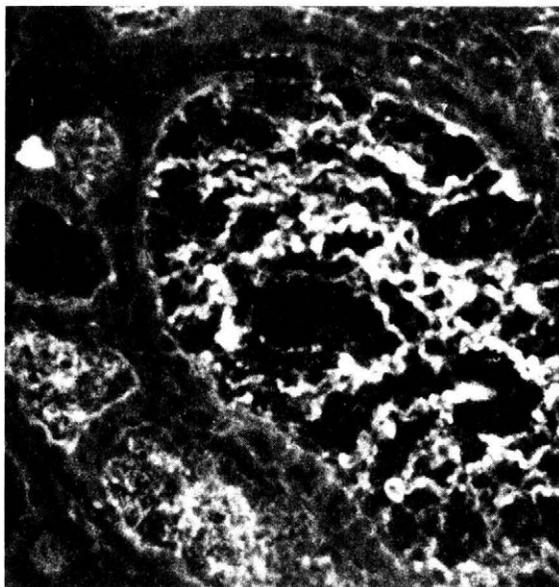
The possible mutual dependence between the LT findings and the presence of serum TgAb and/or MiAb was tested using the chi-square test.

RESULTS

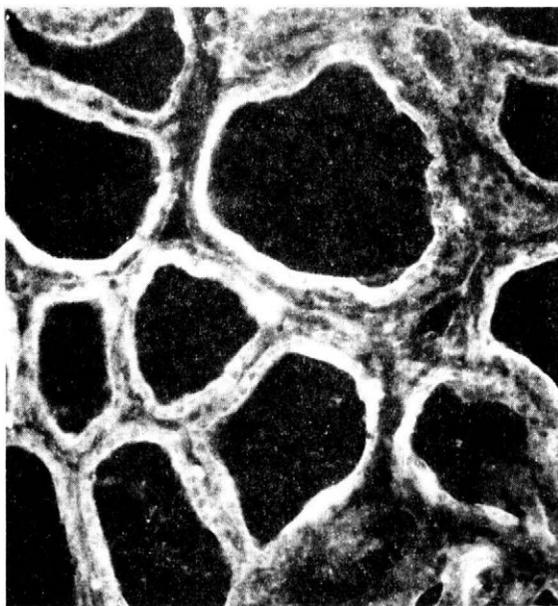
Using the indirect immunofluorescence method, three different serum autoantibodies were revealed and classified according to their binding patterns. The presence of the studied autoantibody was always manifested as the fluorescence of the relevant structures within all the section.

At first, the characteristic web-like fluorescent pattern was detected within the thyroidal colloid (Figs. 1, 2, 3). This fluorescence pattern was classified to be the result of the serum TgAb binding. The frequency of this autoantibody occurrence is shown in Figs. 4 and 5.

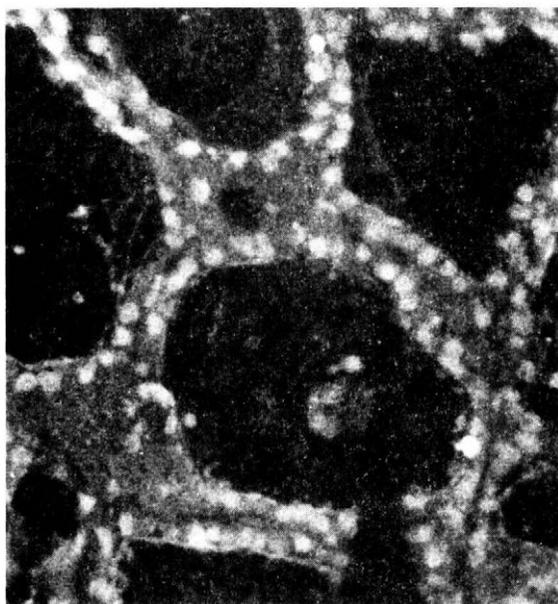
The second fluorescence pattern occurred within the follicular epithelia cytoplasm and cell membranes, sometimes with outstanding nodules in the area of terminal bars (Fig. 2). Such a pattern was related to the presence of the serum MiAb (TPOAb).



1. Evidence of serum TgAb +++ positivity (web-like patterns within the colloid) and serum MiAb ± positivity, SwADog/FITC, 20x



2. Evidence of serum MiAb +++ positivity and serum TgAb ± positivity. SwADog/FITC, 20x



3. Evidence of serum ANAb ++ positivity and serum TgAb ± positivity. SwADog/FITC, 20x

The third serum autoantibody was bound to the nuclei (Fig. 3) and was classified as the antinuclear factor (ANF = ANAb).

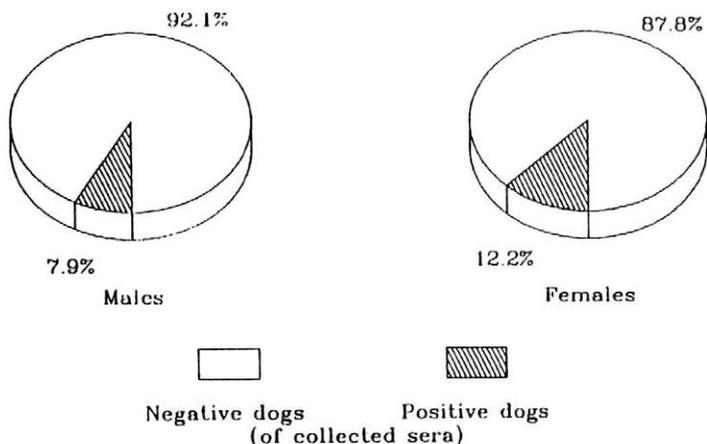
All these autoantibodies were found either individually or in various mutual combinations.

The frequency of autoantibody occurrence is shown in Tab. II.

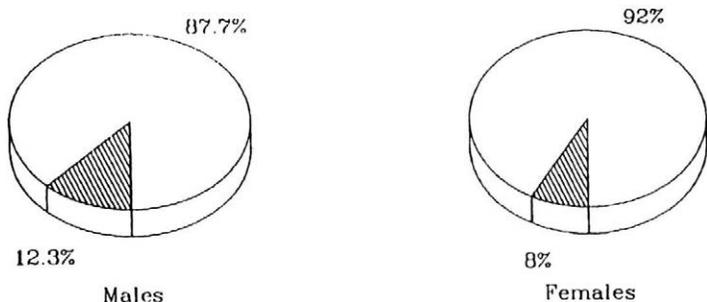
The earliest findings of the above mentioned autoantibodies were revealed during the second half of the

first year of the animals' life. The youngest animal was an 8 months old female with the finding of the serum TgAb. We stated the distribution of the degree of the fluorescence intensity (Figs. 6 and 7). The highest degree was not found in the oldest individuals.

The chi-square test revealed very high probability of the mutual dependence between the histological finding of LT (Vajner et al., 1997) and the presence of the serum TgAb. On the other hand, very low probability



4. Occurrence of serum autoantibodies against Tg (period B)



5. Occurrence of serum autoantibodies against Tg (period C)

of such a dependence was evidenced between the serum MiAb and the LT occurrence.

No morphological correlations to the findings of the ANF were observed.

In one isolated case, we found focal lipomatous atrophy of the thyroid parenchyma. This lesion occurred within one lobe of the gland of a 24 months old male and was associated with the TgAb seropositivity. No lymphocytic infiltrations were found in this case.

DISCUSSION

In our slides, the type of immunofluorescence appeared to be identical to those found by Mizejewski et al. (1971) and Nožička (1991).

The earliest findings of the above mentioned autoantibodies corresponded with the LT occurrence, evidenced histopathologically. Similar correlation appeared between the degree of the histopathologically evidenced involvement (LT) and the immunofluorescence intensity, as well as the age of involved animals (Vajner et al., 1997). The fact of the absence of the highest degree of involvement in the oldest animals is in the absolute accordance with the premise of Pinchera et al. (1995). Although incomplete, an individual coincidence occurred between the histological findings of LT (Vajner et al., 1997) and the findings

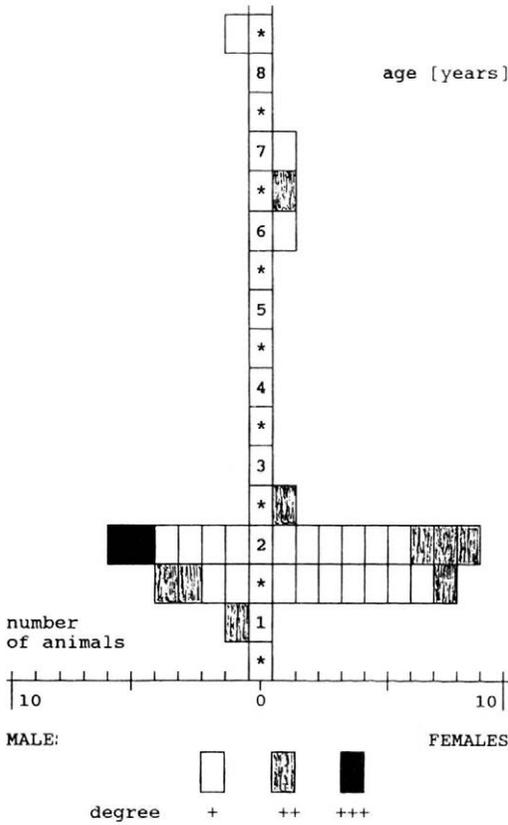
II. Frequencies of serum autoantibodies presence (number of cases and percentage of examined sera)

	Period B (5 years)			Period C (2 years)		
	Total	Males	Females	Total	Males	Females
TgAb	33 10.2%	12 7.9%	21 12.2%	26 10.0%	15 12.3%	11 8.0%
MiAb	56 17.3%	31 20.4%	25 14.5%	64 24.6%	30 24.6%	34 24.6%
ANAb	34 10.5%	12 7.9%	22 12.8%	28 10.8%	9 7.4%	19 13.8%

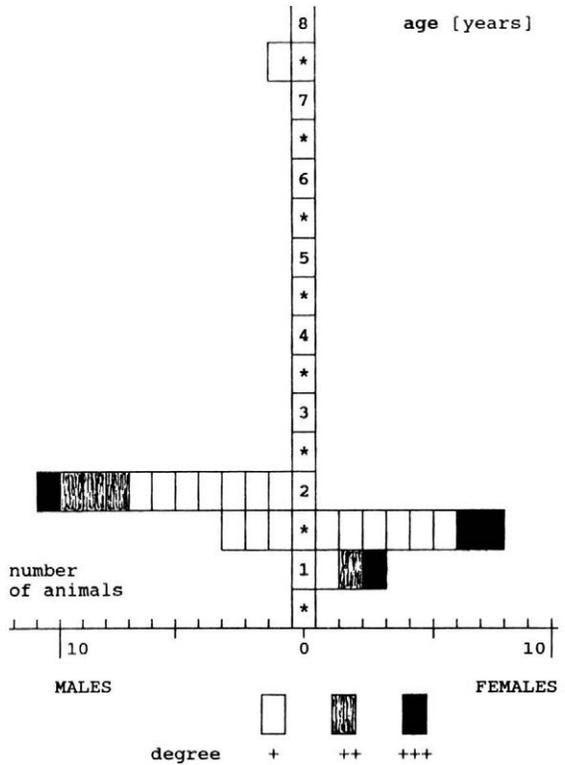
of the serum autoantibody against either thyroglobulin or the microsomal antigen. This finding led to an idea that the appearance or the disappearance of inflammatory changes and the beginning or the extinction of autoimmune reactions were not synchronous processes. The earliest observation of serum autoantibodies preceded the histological evidence by about one month. On the other hand, the oldest individuals showing histologically evidenced LT presented no serum autoantibodies.

The only case of lipomatous atrophy of the thyroid gland was accompanied by the presence of the serum TgAb. There were also differences between the fre-

6. Number and age of animals with the serum positivity of TgAb, histologically both negative and positive (period B)



7. Number and age of animals with the serum positivity of TgAb, histologically both negative and positive (period C)



quency of the histologically evidenced LT (Vajner et al., 1997) and of the presence of the serum autoantibody. During the preliminary B period, the serum TgAb occurrences were of a relatively identical frequency as those of the histological lesion. During C period, the histological findings were less numerous than the serum autoantibody findings. Although, the absolute individual coincidence did not occur during the B period.

The very high probability of the mutual dependence between LT and TgAb was evidenced, but only a very low probability of the mutual dependence between LT and MiAb was documented in the studied Beagle colony. This fact was in accordance with the opinions of Gosselin et al. (1982), Lombardi et al. (1988), McLachlan et al. (1990) and Thacker et al. (1995). These authors documented the different role of these autoantibodies in the thyroid autoimmune disease pathogenesis in man and dog.

As studied dogs served as experimental animals for many different drug safety-evaluating studies or were breeding individuals without any treatment (Vajner et al., 1997), we could state that there was no apparent correlation between external influences and the described involvement.

In our study, we arrived at a conclusion that the lymphocytic thyroiditis in Beagle dogs was in the direct causal relation to the presence of serum autoantibodies against thyroglobulin. In spite of different pathogenesis, the spontaneous canine autoimmune lymphocytic thyroiditis could serve as a suitable model for human medicine, either.

REFERENCES

- GOSELIN, S. J. – CAPEN, C. C. – MARTIN, S. L. – KRAKOWKA, S. (1982): Autoimmune lymphocytic thyroiditis in dogs. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **3**, 185–201.
- LOMBARDI, A. – SANTINI, F. – BASSI, P. – GIUSTI, F. L. – TONACCHERA, M. – CUCCHI, P. – TOSTI BALDUCCI, M. – GRZYCZYNSKA, M. – CHIOVATO, L. – VITTI, P. – MARCOCCI, C. – MARIOTTI, S. – LOPEZ, G. – FENZI, G. F. – PINCHERA, A. (1988): Effects of circulating antibodies in autoimmune thyroid disease. In: MAGGI, M. – JOHNSTON, C. A. (eds.): *Horizons in Endocrinology*. 52. New York, Raven Press. pp. 209–219.
- McLACHLAN, S. M. – ATHERTON, M. C. – NAKAJIMA, Y. – NAPIER, J. – JORDAN, R. K. – CLARK, F. – REES SMITH, B. (1990): Thyroid peroxidase and the induction of autoimmune thyroid disease. *Clin. Exp. Immunol.*, **79**, 182–188.
- MIZEJEWSKI, G. J. – BARON, J. – POISSANT, G. (1971): Immunologic investigations of naturally occurring canine thyroiditis. *J. Immunol.*, **107**, 1152–1160.
- NOŽIČKA, Z. (1991): Patologicko-anatomický příspěvek k protilátkové diagnostice imunopatologických onemocnění. *Sbor. Věd. Práci LF UK, Hradec Králové*, **33** (Suppl. 1), 171 pp.
- PINCHERA, A. – MARIOTTI, S. – BARBESINO, G. – BECHI, R. – SANSONI, P. – FAGIOLO, U. – COSSARIZZA, A. – FRANCESCHI, C. (1995): Thyroid autoimmunity and ageing. *Hormone Res.*, **43**, 64–68.
- RUF, J. – FELDT-RASMUSSEN, U. – HEGEDUS, L. – FERRAND, M. – CARAYON, P. (1994): Bispecific thyroglobulin and thyroperoxidase autoantibodies in patients with various thyroid and autoimmune diseases. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **79**, 1404–1409.
- THACKER, E. L. – DAVIS, J. M. – REFSAL, K. R. – BULL, R. W. (1995): Isolation of thyroid peroxidase and lack of autoantibodies to the enzyme in dogs with autoimmune thyroid disease. *Am. J. Vet. Res.*, **56**, 34–38.
- VAJNER, L. – VORTEL, V. – BREJCHA, A. (1997): Lymphocytic thyroiditis in Beagle dogs in a breeding colony: Histological findings. *Vet. Med. – Czech*, **42**, 43–49.
- WEETMAN, A. P. (1990): Thyroid peroxidase as an antigen in autoimmune thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.*, **80**, 1–3.

Received: 97-06-16

Accepted: 97-07-09

Contact Address:

MVDr. Luděk Vajner, CSc., Ústav histologie a embryologie 2. LF UK, V úvalu 84, 150 18 Praha, Česká republika
Tel. 02/24 43 59 82, fax 02/24 43 58 20, e-mail: Ludek.Vajner@lfmotol.cuni.cz

EFFECT OF SELENIUM ON CADMIUM GENOTOXICITY INVESTIGATED BY MICRONUCLEUS ASSAY

SLEDOVANIE ÚČINKU SELÉNU NA TOXICITU KADMIA POMOCOU MIKRONUKLEUS TESTU

E. Hurná¹, P. Siklenka¹, S. Hurná²

¹Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

²Technical University, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: Cadmium is known to be one of the most toxic environmental and industrial pollutant which produces DNA damage and lipid peroxide *in vitro* and *in vivo*. Antioxidant activity of selenium is known but molecular mechanisms of cadmium toxicity and interaction with antioxidants have not been adequately studied. In our study, micronucleus assay was used for genotoxicity testing. V79 cells (chinese hamster lung fibroblasts) are treated by various concentrations of Cd (5–50 μM CdCl_2) in the first group of experiment and in the second group, the cells were pre-treated by selenium (25 μM Na_2SeO_3) before cadmium application. The protective effect of selenium was observed by no significant increase of micronucleus frequency with various cadmium concentrations (control – 8 MN, 50 μM CdCl_2 – 11 MN) with respect to those obtained with cadmium treatment only (control – 5 MN, 50 μM CdCl_2 – 23 MN).

cadmium; selenium; cell cultures; genotoxicity; micronucleus test

ABSTRAKT: Kadmium je jedným z najtoxickejších znečisťujúcich prvkov životného prostredia, ktorý vyvoláva poškodenie DNA a oxidáciu tukov *in vivo* a *in vitro*. Selén patrí medzi antioxidanty, ktoré môžu ovplyvniť tieto negatívne procesy. Má preventívny účinok proti karcinogenite kadmia, avšak mechanizmus účinku ešte nie je presne známy. V našej práci sme na hodnotenie genotoxicity použili mikronukleus test. Bunky V79 (Chinese hamster lung fibroblasts) sme ovplyvnili rôznymi koncentraciami kadmia (5 až 50 μM CdCl_2) v jednej časti pokusu a v druhej časti pokusu sme bunky predtým ovplyvnili selénom (25 μM Na_2SeO_3). Výsledky poukazujú na to, že selén má ochranný účinok proti genotoxickému účinku kadmia, ktorý sa prejavil tým, že pri zvyšujúcich sa dávkach kadmia sa významne nezvyšovali počty mikrojadier, ako sme pozorovali v pokuse bez ovplyvnenia buniek selénom.

kadmium; selén; bunkové kultúry; genotoxicita; mikronukleus test

INTRODUCTION

Cadmium is known as one of the most toxic environmental and industrial pollutant and also potent carcinogenic agent in humans and animals (Oldríguez et al., 1989; Bell et al., 1991; Stayner et al., 1992; Sugiyama, 1994; Stohs and Bagchi, 1995; Hartwig, 1995). Although cadmium produces DNA damage and lipid peroxide *in vitro* and/or *in vivo* (Muller et al., 1991; Manca et al., 1991), the molecular mechanisms of their toxicity have not been adequately studied. Recent studies have implied that free radicals such as active oxygen species may be involved in the process of metal-induced carcinogenicity and toxicity. Thus, the cellular antioxidant defence system, which removes free radicals may play an important role in the genotoxicity and toxic effects of metal compounds (Sugiyama, 1994).

The element Se is recognised as an essential nutrient for mammals. Dietary Se intake is inversely correlated with mortality from cancer at a number of sites. Like-

wise, laboratory investigations document the ability of supplemental Se to significantly reduce the incidence of virally and chemically induced tumours (Hwang and Milner, 1996). Supplementation of Se is also known to decrease the *in vitro* and *in vivo* growth of some, but not all, neoplastic cells. Differences in Se retention and cellular distribution may account for the differences in susceptibility among tumor cells (Hwang and Milner, 1996; Kuchan et al., 1990).

In the present study the genotoxicity of Cd and possible protective effect of selenium was investigated by micronucleus test.

MATERIAL AND METHODS

V79 cell line

Chinese hamster lung fibroblast cell line V79 was seeded in 75 cm² Falcon tissue flasks with 15 ml

Eagle's Minimal Essential Medium supplemented with 10% fetal bovine serum and antibiotics; 100 U penicillin/ml medium, and 100 µg streptomycin/ml medium in the humidified 5% CO₂ incubator at 37 °C.

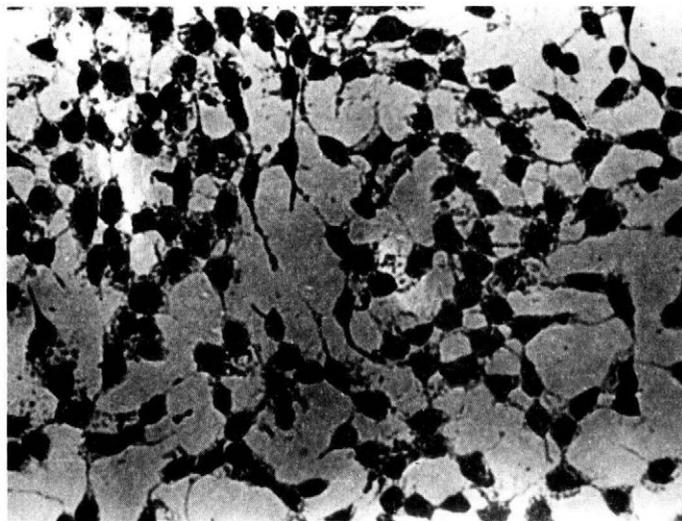
Chemicals

Cadmium chloride, Na₂SeO₃ and cytochalasin B (CYB) were purchased from Sigma and Merck companies.

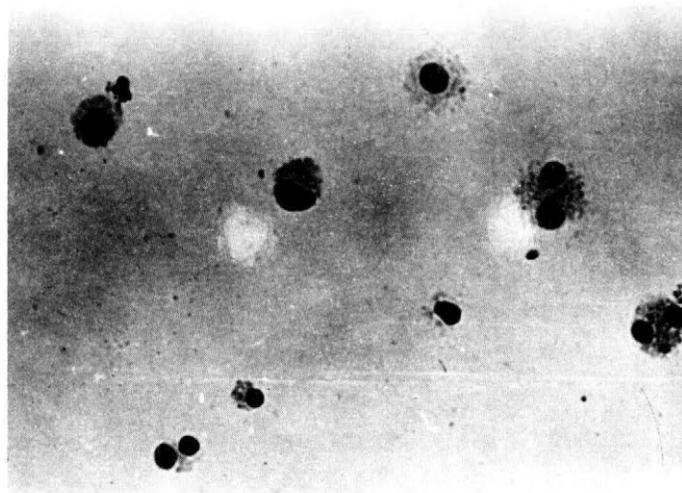
Chemical treatment

Approximately 1–2 million exponentially growing V79 cells (Fig. 1) in a flask of 25 cm² surface area

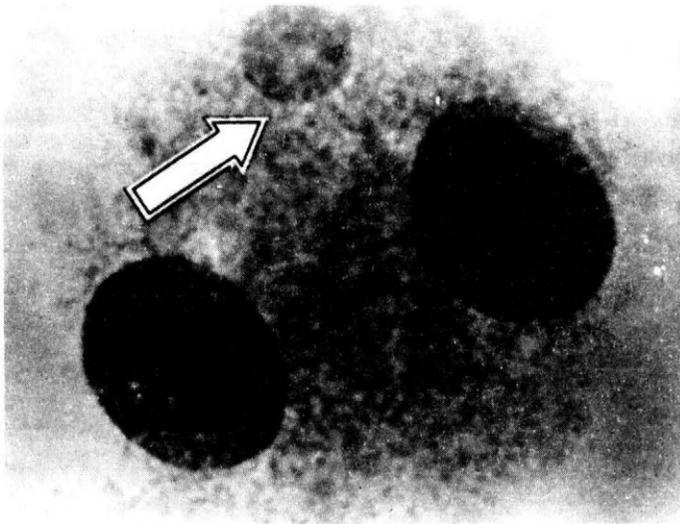
were used for testing genotoxicity. After 24 hr incubation, the various concentrations of cadmium chloride (5–50 µM) were added to the culture cells in the first group of experiment. In the second group of experiment, the cells were pre-treated with 25 µM Na₂SeO₃ for 24 hours and then influenced with cadmium chloride. The micronucleus assay was performed according to an earlier report (K r i s h n a et al., 1989). After further culture for 24 hours, CYB was added to the fresh medium to give a final concentration of 3 µg/ml culture medium. The cells were washed with phosphate buffered saline (PBS). Cells were harvested, washed by centrifugation, resuspended in a hypotonic solution 75 µM KCl for 20 min at 37 °C and fixed in 3 : 1 mixture of methanol-acetic acid 3 times. After hypo-



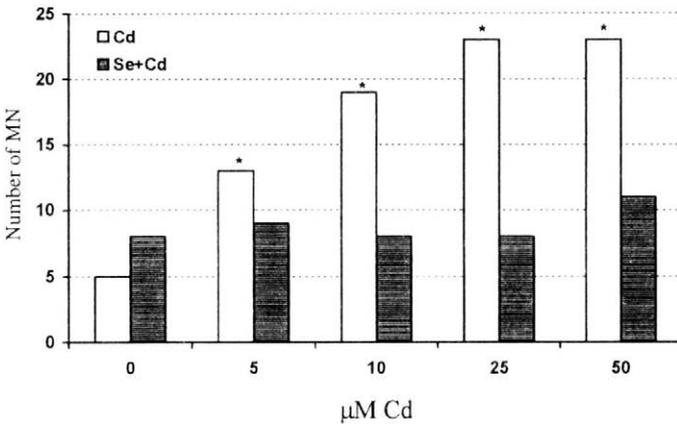
1. V79 cell line (chinese hamster fibroblasts); magnification 200x



2. Binucleated cells; magnification 400x



3. Micronucleus in binucleated cell; magnification 1000x



4. Comparison of micronucleus frequencies in V79 cells induced by cadmium chloride and cadmium chloride after Se pretreatment

* $p < 0.001$

tonic treatment, a small drop of cell suspension was placed onto a clean slide. The slides were finally stained with 3% Giemza. The frequency of micronucleus formation was based on 1 000 binucleated cells (BN) scored in each treatment group (Figs. 2 and 3). For each treatment group, three replicate cultures were used. The Chi square test was used for statistical analysis of data from *in vitro* micronucleus assay (Amphlett and Delow, 1984).

RESULTS AND DISCUSSION

The micronucleus assay data for cadmium chloride treatment showed, that the frequencies of binucleated and micronucleated cells increased over control in a dose-dependent fashion. The results of MN analysis for cadmium chloride with 25 μM Na_2SeO_3 pretreatment are summarised in Fig. 4. Our studies show that

Se slightly increased the number of micronuclei in the control cells with Na_2SeO_3 . When the cells were influenced with various doses of cadmium after Se pretreatment, statistically not significant differences between various doses of Cd were observed.

The protection of selenium on cadmium induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice has also been reported by Mukherjee et al. (1988). Sugiyama (1994) suggested that the mechanism of Cd detoxification by selenium is thought to be related to either the formation of cadmium-selenium complexes in association with MT or the alteration of the tissue distribution of cadmium by selenium. In rat hepatocytes, the decrease in GSH levels induced by cadmium was found to be lowered when selenium was concurrently added to the incubation medium (Bell et al., 1991). Thus, selenium appeared to act as an indirect antioxidant for preventing lipid peroxidation. Fisher and Hofmann (1990) also demonstrated that the

combination of cadmium chloride with selenite provided mutual protection against cytotoxic effects.

In summary, the present study suggests that selenium prevents cadmium genotoxicity which was observed by no changes of MN frequency between control cells and group of cells with various concentration of cadmium.

REFERENCES

- AMPHLETT, G. E. – DELOW, G. F. (1984): Statistical analysis of the micronucleus test. *Mutat. Res.*, 128, 161–166.
- BELL, R. R. – NONAVINAKERE, V. K. – SOLIMAN, M. R. I. – EARLY, J. L. (1991): Effect of *in vitro* treatment of rat hepatocytes with selenium, and/or cadmium on cell viability, glucose output, and cellular glutathione. *Toxicology*, 69, 111–119.
- FISCHER, A. B. – HOFMANN, J. (1990): Studies of cadmium cytotoxicity and genotoxicity – Cell cycle effects and cytogenetic findings in cultured mammalian cells. *Toxicol. and Environ. Chem.*, 27, 143–152.
- HARTWIG, A. (1995): Current aspects in metal genotoxicity. *BioMetals*, 8, 3–11.
- HWANG, K. – MILNER, J. A. (1996): Intracellular distribution of selenium and the growth of mammary cells in culture. *Biol. Trace Elem. Res.*, 51, 133–147.
- KRISHNA, G. – KROPKO, M. L. – THEISS, J. C. (1989): Use of the cytokinesis-block method for the analysis of micronuclei in V79 Chinese hamster lung cells: results with mitomycin C and cyclophosphamide. *Mutat. Res.*, 222, 63–69.
- KUCHAN, M. J. – FICO-SANTORO, M. A. – MILNER, J. A. (1990): Consequences of selenite supplementation on the growth and metabolism of cultures of canine mammary cells. *J. Biochem. Nutr.*, 1, 478–483.
- MANCA, D. – RICARD, A. C. – TROTTIER, B. – CHEVALIER, G. (1991): Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*, 67, 303–323.
- MULLER, L. – SCHUCKELT, R. – JAENICKE, L. (1991): Cadmium/zinc metallothionein induces DNA strand breaks *in vitro*. *Arch. Toxicol.*, 65, 20–26.
- MUKHERJEE, A. – SHARMA, A. – TALUKDER, G. (1988): Effect of selenium on cadmium-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of mice. *Toxicol. Lett.*, 41, 23–29.
- OLDRIGES, H. – HOCHRAINER, D. – GLASER, U. (1989): Long-term inhalation study with Wistar rats and four cadmium compounds. *Toxicol. Environ. Mol. Mutagen.*, 19, 217–222.
- STAYNER, L. – SMITH, R. S. – THUN, N. – SCHNORR, T. – LEMEN, R. A. (1992): Dose-response analysis and quantitative assessment of lung cancer risk and occupational cadmium exposure. *Ann. Epidemiol.*, 2, 177–194.
- STOHS, S. J. – BAGCHI, D. (1995): Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18(2), 321–336.
- SUGIYAMA, M. (1994): Role of cellular antioxidants in metal-induced damage. *Cell Biol. Toxicol.*, 10, 1–22.

Received: 97-06-09

Accepted after corrections: 97-08-05

Contact Address:

MVDr. Edita Hurná, Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika
Tel. 095/633 74 29, fax 095/633 18 53

VIIth CONFERENCE OF EUROPEAN ASSOCIATION OF SCIENCE EDITORS

VI. KONFERENCE EVROPSKÉ ASOCIACE VĚDECKÝCH EDITORŮ

Kvalita vědeckých sdělení je neustále v popředí zájmu vědeckých pracovníků, agentur financujících výzkum a stále více i nakladatelů a vydavatelů vědeckých publikací, včetně periodik. Pro ně zejména se primární produkt vědeckého bádání stal významným obchodním artiklem. Vazby a závislosti mezi producenty, zprostředkovateli a uživateli vědeckého poznání jsou stále těsnější, ale i napjatější. Mezi těmito složkami působí i další, informace o informacích – referátové časopisy. Zejména v posledních třiceti letech překotného vývoje počítačových systémů jich vyrostla celá řada (Holub, 1996) a s nimi další produkty, různé databáze na nových médiích. To vše na jedné straně nesmírně urychluje tok informací a usnadňuje orientaci ve vědě (například kdyby dnešní fyziolog měl přečíst při osmihodinovém čtení denně vše, co se přímo týká jeho oboru, zaostával by každoročně o 25 měsíců za tiskovou produkci; Trojan, 1997), na straně druhé přispívá k tenzím i polarizaci mezi rozvinutými a rozvojovými zeměmi i tím, že tyto informační systémy ponechávají zcela bez povšimnutí vědeckou produkci větší části světa (Gibbs, 1995).

Jeden z ambiciózních soukromých podniků tohoto typu, Institute for Scientific Information (Philadelphia, USA), z dnešních více než 70 tisíc vědeckých periodik jich excerptuje pouze asi 3,5 tisíce, tedy zlomek. Přesto svými produkty (citačními indexy, impact faktory) do značné míry ovlivňuje osudy vědeckého bádání ve světě, a to i u nás, protože až příliš často bývá jako jediné kritérium vědecké práce uplatňována právě citovanost v tomto systému. Pokud je malá, nepřídelují se granty, ba likvidují se vědecká pracoviště.

Tlaky na kvalitu vědeckých publikací a časopisů ve světě jsou i jedním z důvodů, proč se konalo již šesté shromáždění a konference European Association of Science Editors (EASE), letos ve dnech 24. až 28. května v Helsinkách, a bylo ve znamení „Kvalita v komunikaci: úloha redaktora“. Zúčastnilo se jej na 250 vydavatelů, redaktorů, překladatelů z 25 zemí.

Na slavnostním zasedání v aule helsinské univerzity zahájil konferenci její rektor *prof. K. Raivio*. Zdůraznil práci redaktorů vědeckých periodik i jako součást akademického hodnocení vědecké práce univerzitních a výzkumných institucí, dále jejich roli v rozšiřování vědeckých poznatků a také v dodržování etických norem při zveřejňování výsledků výzkumu. Uvedl, že i ve Finsku se hodnocení institucí a přidělování prostředků na výzkum dnes řídí impact faktory, i když je to pokládáno za absurdní, nezdravé a zavádějící. Impact faktor byl tedy ekonomizován, a je nutno se s tím vyrovnat. Jedním ze základních a účinných způsobů, jak tyto ukazatele zlepšovat, je nanejvýš objektivní, pravdivý a čestný proces oponování rukopisů.

Odstupující prezident EASE, *Dr. H. Maissonneuve*, se zabýval nutností neustále zlepšovat úroveň vědeckých časopisů, rozlišovat mezi vědou dobrou a pseudovědou, mezi fakty a názory. Zdůraznil, že posláním konference je podělit se o zkušenosti v editorské práci pro další pokrok vědy ve svě-

tě. Bývalý kancléř univerzity, *prof. L. Saxén*, hovořil o několika kategoriích podvodů ve vědě, o nutnosti učit mladé pracovníky etice vědecké práce a publikování. Komentoval také případy tzv. čestného autorství („honorary authorship“), kdy je jméno někoho připsáno na práci, aniž by se jí jakkoli účastnil, jako naprosto nepřipustné a amorální.

V pracovní části konference pak po tři dny probíhalo dopoledne i odpoledne vždy sedm paralelních sekcí, a mezi ně byla zařazena tři plenární zasedání. Jejich náplní byly přednášky předních odborníků (např. *D. Rennie*, *JAMA*, *E. Huth*, *Annals of Internal Medicine*, *J. Smith*, *British Medical Journal* a další) o kontrole práce redaktorů a lektorů, o kvalitě publikací v elektronickém věku, a poslední na téma zda kvalita publikování znamená totéž pro autory a editory.

Jednotlivé sekce měly 15 až 30 účastníků, byly většinou velmi dobře moderovány a zabývaly se těmito okruhy otázek:

1. internet pro redaktory; od papíru k obrazovce – produkce elektronických časopisů, publikování na CD ROM;
2. kontakty mezi redaktory, editování ve světě, jak si lze vzájemně pomáhat;
3. jazykové otázky, kvalita překladů do angličtiny, univerzálního vědeckého jazyka, a úloha jiných kultur, kolik editování a kolik jazykových úprav, publikování anglicky anebo v lokálních jazycích – výhody a rizika;
4. editování knih autorských kolektivů, technických zpráv, proceedings z konferencí a jiných materiálů;
5. školení editorů, úloha EASE, svoboda redaktorů, redakční úpravy rukopisů;
6. etické otázky pro redaktory, podvody ve vědě, kdo je autorem práce, duplicitní publikace;
7. interakce mezi redaktory, autory a oponenty, význam oponování pro kvalitu vědecké práce;
8. příprava grafů a další dokumentace;
9. struktura rukopisů, abstraktu, instrukce pro autory;
10. otázky právní, otázky copyrightu ap.

Několik sekcí bylo věnováno využívání elektronického publikování, zejména pro urychlení celého procesu. Například *Medical Journal of Australia* právě provádí rozsáhlou studii: se souhlasem autorů zveřejní rukopis, již lektorovaný tradičním způsobem a přijatý k publikaci, na jeden měsíc na Internetu. Zatímco je rukopis připravován k tisku, probíhá ještě jakési druhé kolo, otevřené oponování rukopisů, kdy redakce vyzývá další oponenty a zasvěcené čtenáře ke komentářům. Ty pak předá autorům ke zvážení a případným úpravám. Teprve poté vychází práce v tištěné podobě. Redakce také vyhodnocuje a srovnává výkony oponentů. Výsledky studie budou předneseny na třetím kongresu o biomedicínských publikacích, který se bude konat v září t. r. v Praze. Diskutovalo se i o úskalích elektronických verzí časopisů, jejichž způsob archivování zatím nebyl uspokojivě vyřešen, podobně jako způsob citování materiálů uvedených výlučně v elektronických médiích. Elektronické publikování dnes využívá především matematika, fyzika a informatika; z medicínských

věd pouze zlomek. Hlavním problémem je zveřejnění na Internetu na krátký čas. Proto se neočekává, že by tato forma nahradila tradiční vědecké časopisy. I zde bylo zdůrazněno, že elektronické publikování pak dále rozděluje svět bohatých a chudých zemí a jejich přístup k informacím.

Tato otázka byla zevrubně probírána i v dalších sekcích, například Indie má po USA největší počet vědeckých pracovníků v biomedicínských vědách, ale z více než 300 indických lékařských časopisů je pouze asi jedna desetina v Current Contents nebo jiných západních informačních systémech. Přitom nejlepší práce musí indičtí pracovníci publikovat mimo své země, aby měly naději proniknout do světa. Velkou explozí vědecké produkce a informací prochází i Čína: v roce 1970 tam vycházelo na 300 časopisů, dnes je to přes čtyři tisíce vědeckých periodik, která však do světového fondu vědy přispívají zatím jen velmi málo. Diskutovalo se o možnostech zřídit nové, lokální či regionální informační systémy a indexové služby, například za pomoci WHO a jiných organizací.

Několik dalších sekcí bylo věnováno jazykové stránce vědeckých prací, používání angličtiny v neanglických kulturních oblastech světa. Nebyla nalezena uspokojivá odpověď na otázku, zda má anglosaský svět právo vnucovat svůj způsob vyjadřování jiným kulturám, například hispánské, či kulturám jiných kontinentů. Někteří diskutující upozornili, že sjednocováním stylu se do značné míry stírá osobitost slovního projevu autorů. Diskutovalo se o práci editorů v různých oblastech světa a o nutnosti přispívat k efektivnímu sdělování vědeckých poznatků mezi kulturami. Pozornost byla opakovaně věnována dobré vědecké angličtině, zejména pak jednoznačnému prezentování faktů. Každý text musí být přitom připraven s ohledem na čtenáře. Redaktoři pokládají srozumitelnost textu za důležitější než lingvistickou stránku publikací. Za velmi významnou pro zlepšování rukopisů pokládají zejména práci oponentů. Přesto byla některými rekurujícími hodnocena velmi kriticky: až jedna třetina posudků je málo relevantní, mnoho závažných chyb a nedostatků zůstává nepovšimnuto, a i zde panuje korupce, diskriminace jak pracovišť, tak autorů.

Struktura vědecké práce byla rozebírána také, a z diskusí vyplynulo, že její uspořádání IMRAD (Introduction, Materials and Methods, Results and Discussion) zatím nebylo překonáno a ničím lepším jej nelze nahradit. K poučným patřila také sekce o instrukcích pro autory, jenž zabírají v některých časopisech přes 20 stran. Přednášející srovnávali účinnost stručných a dlouhých, vyčerpávajících instrukcí a shodli se v názoru, že všechny jsou autory do jisté míry ignorovány. Doporučují tedy uvádět instrukce menšího rozsahu a zveřejňovat je v každém čísle časopisu.

Jiné sekce se zabývaly kvalitou a osudy tzv. periferních časopisů, které se periferními stávají jednak proto, že nebývají zahrnuty do databázových systémů, a také proto, že práce v nich zveřejněné bývají málo citovány. Protože v databázích nejsou, nepublikují v nich renomovaní autoři; nemají-li dobré autory, ani šance na zlepšení kvality těchto periodik nejsou dobré. Takový osud byl demonstrován na polském genetickém časopisu. Ten byl kdysi v Current Contents, avšak kvůli problémům s termíny tiskárny a nakladatelství (i my jsme je důvěrně znali) byl z této databáze vyloučen.

Ani přes rozsáhlá opatření, která vedla ke zlepšení odborné i jazykové úrovně, se nepodařilo časopis do CC vrátit a dnes je prakticky před zánikem.

Přednášející v poslední plenární sekci se zamýšleli nad tím, co je kvalita publikací. Kdo je vůbec oprávněn o ní rozhodovat? Jsou to čtenáři, editoři, oponenti, grantové agentury? Na tuto otázku není jednoznačná odpověď, a proto je zřejmě vhodnější mluvit o zlepšování časopisů. Produkt – vědecký časopis – musí poskytovat to, co jeho uživatelé očekávají, a to za přijatelnou cenu. Protože ceny se snižovat nebudou, lze jít pouze cestou zdokonalování vědeckých časopisů. Zlepšování editorské práce znamená dbát i na jasné, srozumitelné formulace, odstraňovat nejednoznačné věty či pasáže z textů, pečovat o harmonickou prezentaci a atraktivnost prací. Každé zamítnutí rukopisu musí být založeno na faktech, nikoli předpokladech a domněnkách. Dobrý redaktor by měl odhalit i podvody v rukopisech, nepřipustit tzv. „salami-publishing“, dělení rukopisů na nejmenší publikovatelné jednotky. Zároveň je třeba mít na zřeteli, že autoři prací jsou i uživateli děl jiných autorů, a také uživateli časopisů. Čtenáři tedy rozhodují o kvalitě tím, co čtou, a tak rozhodují o tom, zda je práce editorů dobrá. Věda má budoucnost pouze s dobrými pracemi, s novými poznatky. Zda práce přináší nová fakta pro vědu, posuzuje oponentní řízení. Obrovský potenciál je v rychlosti publikování za pomoci nových médií: elektronické publikování již umožňuje práci zveřejnit za 24 h po předložení redakci. Revolucionizují se takto i komunikace mezi autory, oponenty, redakcemi a uživateli. Podle posledního řečníka však nežijeme v době či společnosti informací. Naopak, vskutku významné informace jsou tak dobře ukryty, že je velmi nesnadné se k nim dostat. Příliš mnoho materiálu se ve světě zpracovává, ale i nenávratně ztrácí. Vývoj editořských aktivit je překotný, ale i plný rozporů: jedni předpokládají explozi počtu časopisů na 100 tisíc kolem roku 2000, jiní očekávají naopak pokles počtu periodik a omezování subskripcí institucemi pro stále rostoucí ceny. Na druhé straně dochází ke globalizaci obrovského trhu vědy, kde jsou časopisy v tvrdé kompetici.

Ze všech zasedání kongresu, jež byla až do konce plně obsazena, byla zřejmě úporná snaha redaktorů, vydavatelů, jazykových lektorů o hledání dalších cest a možností k neustálému zlepšování vědeckých časopisů. Každý z účastníků si mohl pro svou práci odnést množství intelektuálních stimulů a především pocit, že je spojen s velkou komunitou, která se potýká se stejnými problémy a sdílí stejné cíle. Vždyť význam editořské činnosti, která se dynamicky proměňuje a snaží se identifikovat své nové funkce, v dnešní době informačních superdálnic stále vzrůstá.

LITERATURA

- GIBBS, W. W. (1995): Lost science in the third world. *Sci. Am.*, 273, 76–83.
HOLUB, A. (1996): České veterinární publikace ve světové informační bázi. *Vet. Med. – Czech*, 41, 129–132.
TROJAN, S. (1997): K historii fyziologické společnosti. *Čs. Fyziol.*, 46(2), 92–94.

E. Baranyiová

*Veterinární a farmaceutická univerzita, Palackého 1–3, 612 42 Brno
Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno*

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 zřetelem k lektorským posudkům, vědeckému významu a přínosu a kvalitě práce. Redakce přijímá práce imprimitované 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.

Rukopis má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. 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 jej (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 informace, 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 hodnocení 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 citovaná v textu práce se uvádí jménem autora a rokem vydání. Do seznamu se zařadí jen publikace citované v textu. Citace se řadí abecedně podle jména prvních autorů.

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 plně jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PSČ, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Applications for detailed instructions for authors should be sent to the editorial office.

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 papers 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 should be typed on standard paper (quarto, 30 lines per page, 60 strokes per line, double-spaced typescript). A PC diskette with the paper text or graphical documentation should be provided with the paper manuscript, indicating the used editor program. 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.

References in the manuscript are given in form of citations of the author's name and year of publication. A list of references should contain publications cited in the manuscript only. References are listed alphabetically by the first author's name.

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.

VETERINARY MEDICINE – CZECH

Volume 42, No. 11, November 1997

CONTENTS

Raszyk J., Toman M., Gajdůšková V., Nezveda K., Ulrich R., Jarošová A., Dočekalová H., Salava J., Palác J.: Effects of environmental pollutants on the porcine and bovine immune systems (in English).....	313
Molnárová M., Pástorová B.: Changes in ovarian activities after superovulatory treatment of sheep.	319
Mikulec K., Sušić V., Šerman V., Mikulec Ž., Pipić R., Balenović T., Matičić D.: Lamb fattening and carcass characteristics of croatian crossbred dairy sheep (in English)	327
Vajner L.: Lymphocytic thyroiditis in Beagle dogs in a breeding colony: findings of serum autoantibodies (in English)	333
Hurná E., Siklenka P., Hurná S.: Effect of selenium on cadmium genotoxicity investigated by micronucleus assay (in English).....	339
INFORMATION	
Baranyiová E.: VIth conference of european association of science editors.....	343

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 42, č. 11, Listopad 1997

OBSAH

Raszyk J., Toman M., Gajdůšková V., Nezveda K., Ulrich R., Jarošová A., Dočekalová H., Salava J., Palác J.: Vliv polutantů stájového prostředí na imunitní systém prasat a krav.....	313
Molnárová M., Pástorová B.: Zmeny ovariálních aktivit po superovulačnom ošetrení oviec.....	319
Mikulec K., Sušić V., Šerman V., Mikulec Ž., Pipić R., Balenović T., Matičić D.: Výkrm jehňat a jatečná hodnota kříženců mléčných ovcí v Chorvatsku	327
Vajner L.: Lymfocytární thyreoiditis psů plemene beagle v chovné kolonii: nálezy sérových autoprotilátek	333
Hurná E., Siklenka P., Hurná S.: Sledovanie účinku selénu na toxicitu kadmia pomocou mikronukleus testu.....	339
INFORMACE	
Baranyiová E.: VI. konference evropské asociace vědeckých editorů.....	343

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1997

Rozšiřuje Ústav zemědělských a potravinářských informací, referát odbytu, Slezská 7, 120 56 Praha 2