

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

3

VOLUME 43
PRAHA
MARCH 1998
CS ISSN 0375-8427

Mezinárodní vědecký časopis vydávaný z pověření Ministerstva zemědělství České republiky a pod gescí 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., PhD., 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 Hofírek, 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 Hořín, CSc., University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic

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

Doc. MVDr. Dr. Jozef Laurinčík, DrSc., Institute of Genetics and Experimental Biology, RIAP, Nitra, Slovak Republic

Prof. MUDr. M. V. Nermut, PhD., 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., Jilové u Prahy, Czech Republic

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

Editor-in-Chief – Vedoucí redaktorka

Ing. Zdeňka Radošová

World Wide Web (URL): <http://www.clark.cz/vri/casopis.htm>

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 43 vychází v roce 1998.

Přijímání rukopisů: Rukopisy ve třech 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: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory lze vyžádat v redakci.

Informace o předplatném: Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zaslají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1998 je 624 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 43 appearing in 1998.

Acceptance of manuscripts: Three 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: editor@login.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 1998 is 145 USD (Europe), 152 USD (overseas).

THE EFFECT OF RESPIRATORY DISEASES IN CALVES ON THE BLOOD GAS VALUES AND ACID-BASE BALANCE

VPLYV OCHORENÍ RESPIRAČNÉHO APARÁTU U TELIAT NA HODNOTY KRVNÝCH PLYNOV A ACIDOBÁZICKÚ ROVNOVÁHU

O. Nagy, A. Michna, G. Kováč, H. Seidel, I. Paulíková

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: In 43 calves at the age of 1–10 months with diagnosis of respiratory syndrome related to clinical finding, parameters of acid-base balance and blood gases: topical acidity – pH, partial pressure of carbon dioxide – $p\text{CO}_2$, partial pressure of oxygen – $p\text{O}_2$, saturation of blood haemoglobin by oxygen – SAT, topical bicarbonate – HCO_3^- and excess of bases – BE. Calves were hospitalized on the clinic, they were clinically examined before blood taking and according to the degree of affection of the respiratory system they were divided into three groups – respiratory syndrome of light degree – Rsd 1 ($n = 13$), medium degree Rsd 2 ($n = 15$) and heavy degree Rsd 3 ($n = 15$). Clinical examinations were performed by routine clinical examination methods. Arterial blood, taken by puncture from *a. axillaris*, was examined and after taking it was analyzed on automatic analyzer ABL4, manufactured by Radiometer Copenhagen. The results obtained were compared with the values obtained from clinically healthy calves – Rsd 0 ($n = 20$). It was found from the results attained (Tabs. I to II) that even in light degree of disease – Rsd 1 and 2 – significant changes were only in $p\text{O}_2$ ($p < 0.001$) and partial respiratory insufficiency occurs, while in the other investigated indicators more significant changes compared with healthy calves were found in heavy form of disease (Rsd 3) and were characterized by more significant decrease in $p\text{CO}_2$, by increase of $p\text{CO}_2$ values on average to 7.51 kPa ($p < 0.001$) and incidence of global respiratory insufficiency. In addition, increase of the values of bicarbonates and BE proportionally with graveness of the disease (Rsd 3, $p < 0.001$) as a manifestation of compensatory controlling mechanisms of the body, responding to increasing $p\text{CO}_2$ and occurrence of respiratory acidosis. This was shown by maintenance of blood pH within range of physiological values (7.36–7.44) almost in 50% of calves of the group Rsd 3. Acidemia (as a consequence of non-compensatory respiratory acidosis) was found in most severe statuses when $p\text{CO}_2$ achieved the values from 9 to 10 kPa. As follows from the results, significant trends related to the seriousness of disease were recorded not only in blood gases – $p\text{O}_2$ and $p\text{CO}_2$, but also in other parameters of acid-base balance – pH, HCO_3^- and BE, and these are presented in Tab. III. The results obtained deepened the current knowledge in the sphere of the effect of disease of the respiratory system on internal medium and showed that in diseases of respiratory system analysis of blood gases as well as investigated parameters of acid-base balance of arterial blood is a significant component of evaluation of the degree of affection what extends possibilities of diagnostics together with determination of prognosis before and during therapy.

calves; respiratory syndrome; arterial blood; blood gases; acid-base balance

ABSTRAKT: U 43 teliat vo veku jeden až 10 mesiacov s diagnózou respiračný syndróm sme vo vzťahu ku klinickému nálezu hodnotili parametre acidobázickej rovnováhy a krvné plyny: aktuálnu aciditu – pH, parciálny tlak oxidu uhličitého – $p\text{CO}_2$, parciálny tlak kyslíka – $p\text{O}_2$, saturáciu hemoglobínu krví kyslíkom – SAT, aktuálny bikarbonát – HCO_3^- a prebytok báz – BE. Tefatá boli hospitalizované na klinike, pred odberom krvi boli klinicky vyšetrené a podľa stupňa postihnutia respiračného aparátu zaradené do troch skupín – respiračný syndróm ľahkého stupňa – Rsd 1, stredného stupňa – Rsd 2 a ťažkého stupňa Rsd 3. Klinické vyšetrenia boli vykonávané bežnými klinickými vyšetrovacími metódami. Vyšetrovali sme arteriálnu krv odobratú punkciou *a. axillaris* a po odbere analyzovali na automatickom analyzátore ABL4 fy Radiometer Copenhagen. Získané výsledky boli porovnávané s hodnotami získanými od 20 klinicky zdravých teliat. Z dosiahnutých výsledkov sme zistili, že už i pri ľahšom stupni ochorenia – Rsd 1 dochádza k významným zmenám hodnôt $p\text{O}_2$ ($p < 0,001$) a vzniká parciálna respiračná insuficiencia, kým u ostatných sledovaných ukazovateľov výraznejšie rozdiely oproti zdravým tefatám boli zistené až pri ťažkej forme ochorenia (Rsd 3) so vzostupom hodnôt $p\text{CO}_2$ a vznikom globálnej respiračnej insuficiencie. Zvýšenie hodnôt bikarbonátov a BE úmerne so závažnosťou ochorenia je prejavom kompenzačných regulačných mechanizmov organizmu, odpovedajúci na zvyšujúci sa $p\text{CO}_2$ a vznik respiračnej acidózy. To sa prejavilo udržiavaním pH krvi v medziach fyziologických hodnôt aj takmer u 50 % teliat v skupine Rsd 3. Acidémia (ako následok nekompenzovanej respiračnej acidózy) bola zistená až pri najťažších stavoch, kedy $p\text{CO}_2$ dosiahlo hodnôt 9 až 10 kPa. Dosiahnuté výsledky rozšírili doterajšie poznatky v oblasti vplyvu ochorenia respiračného aparátu na vnútorné prostredie a preukázali, že pri ochoreniach respiračného aparátu predstavuje analýza krvných plynov, ako aj sledovaných parametrov acidobázickej rovnováhy arteriálnej krvi, významnú súčasť hodnotenia stupňa jeho postihnutia, čím rozširuje možnosti diagnostiky, ako aj stanovenia prognózy pred, ako aj v priebehu terapie.

teľatá; respiračný syndróm; arteriálna krv; krvné plyny; acidobázická rovnováha

ÚVOD

Ochorenia respiračného aparátu u teliat predstavujú závažný ekonomický problém živočíšnej produkcie. S tým súvisí aj neustála snaha o hľadanie spôsobov a ciest tieto ochorenia účinne zdolávať vzhľadom na ich významný podiel aj na celkovej chorobnosti a stratách v chovoch hovädzieho dobytku. Najčastejším pomenovaním v literatúre pre toto ochorenie je „enzootická pneumónia, bronchopneumónia, resp. respiračný syndróm teliat“. Respiračný syndróm v užšom slova zmysle predstavuje komplex hromadných zápalových ochorení dýchacích orgánov vyvolaných patogénnymi a oportúnnymi vírusmi a baktériami za nepriaznivého spolupôsobenia faktorov ekosystému a za podmienok narušenej odolnosti teliat (Slaniņa, 1991). Výskytu ochorenia respiračného aparátu predchádzajú často stresové stavy, napr. transport ako jeden z najčastejších fyzikálnych a psychických stresorov, s nepriaznivým účinkom na vnútorné prostredie organizmu – acidobázická, imunologická, resp. hormonálna odozva apod. (Michna, 1978; Breazile, 1988; Mudroň a i., 1994, 1996).

Napriek mnohým poznatkom v etiológii, metafylaktickým a profylaktickým opatreniam zostáva terapeutický efekt často menej uspokojivý. I keď sú známe rôzne formy ochorenia dýchacích orgánov teliat, ich klinický prejav je často málo diferencovaný. Pretože respiračný aparát je veľmi dôležitý z hľadiska jeho funkcie výmeny plynov, jeho ochorenia môžu svojimi dôsledkami výrazne zasiahnuť do acidobázickej rovnováhy organizmu, oxygenácie tkanív a vylučovania oxidu uhličitého. Literárne údaje poukazujú na to, že acidobáza u teliat postihnutých respiračným syndrómom má trend k významným zmenám hodnôt krvných plynov (Collie, 1992; Schäfer a i., 1992; Reinhold a Födisch, 1993). Príčinou vzniku respiračnej acidózy je ťažké postihnutie pľúc globálnou respiračnou insuficienciou (Deegen, 1983) a možný pokles pH je v tomto prípade následkom vzostupu $p\text{CO}_2$ arteriálnej krvi a zlyhania regulačnej schopnosti obličiek (vylučovanie H^+ a retencia HCO_3^-).

Cieľom našej práce bolo v rámci klinickej a laboratórnej diagnostiky získať praktické poznatky o zmenách sledovaných parametrov vnútorného prostredia organizmu v priebehu patogenézy rôzneho stupňa ochorenia respiračného aparátu, jeho odzraze na funkčnú schopnosť pľúc (difúzia plynov), a prispieť tým k možnosti rozšírenia diagnostiky týchto ochorení u zvierat.

MATERIÁL A METÓDY

Klinické vyšetrenie teliat

U 43 teliat hospitalizovaných na klinike vo veku jeden až 10 mesiacov s diagnózou respiračný syndróm sme pred odberom krvi vykonali klinické vyšetrenie a posúdenie stupňa postihnutia respiračného aparátu. Na základe získaných výsledkov vyšetrenia boli telatá zaradené do troch skupín: respiračný syndróm ľahkého

stupňa – Rsd 1, stredného stupňa – Rsd 2 a ťažkého stupňa – Rsd 3. Klinické vyšetrenia boli vykonávané bežnými klinickými vyšetrovacími metódami (Rosenberger, 1990; Slaniņa, 1993) a klasifikácia jednotlivých stupňov respiračného syndrómu bola vykonaná predtým, než boli k dispozícii výsledky vyšetrení acidobázickej rovnováhy a krvných plynov. Základnými kritériami pre posúdenie stupňa postihnutia bol klinický nález zohľadňujúci:

- vyšetrenie všeobecného stavu
 - anamnéza: správanie sa a reakcie na okolie, príjem krmiva, telesná teplota, výživný stav;
- vyšetrenie respiračného aparátu
 - adspekcia: výtoky z nosných otvorov (charakter, množstvo), dýchanie (frekvencia, kvalita, typ), dyspnoe (expiračné, inspiračné, zmiešané), kašeľ (spontánnosť, frekvencia, charakter);
 - auskultácia: zoslabenie, zosilnenie vezikulárneho alebo bronchiálneho šelestu, prídavné šelesty, rozsah nálezu;
 - perkusia: rozsah a lokalizácia stemnenia, príp. tympanického poklepu.

Odber krvi a analyzované parametre

Krv na analýzu parametrov acidobázickej rovnováhy (ABR) a krvných plynov (KP) bola odoberaná z *arteria axillaris* jej priamou punkciou do sklenených heparinizovaných kapilár alebo plastických 1 ml striekačiek od fy Radiometer Copenhagen s vyplneným mŕtvym priestorom roztokom heparínu o koncentrácii heparínu 500 m. j. na 1 ml roztoku. Odoberatá krv bola analyzovaná do 10 min po odbere a analyzovaná na prístroji ABL 4 fy Radiometer Copenhagen. Hodnotili sme tieto parametre: aktuálnu aciditu – pH, parciálny tlak oxidu uhličitého – $p\text{CO}_2$, parciálny tlak kyslíka – $p\text{O}_2$, saturáciu hemoglobínu v krvi kyslíkom – SAT, aktuálny bikarbonát – HCO_3^- a prebytok báz – BE. pH, $p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$ predstavujú analyzátorom priamo merané parametre, HCO_3^- , BE a SAT sú analyzátorom udané vypočítané hodnoty. Získané výsledky od chorých teliat boli porovnávané s hodnotami získanými od 20 klinicky zdravých teliat – Rsd 0.

Štatistické vyhodnotenie

Štatistické hodnotenie získaných výsledkov bolo vykonané v programe Statgraphics hodnotením aritmetických priemerov a smerodajných odchýlok sledovaných parametrov jednotlivých skupín teliat. Významnosť rozdielov priemerných hodnôt ukazovateľov medzi skupinami sme hodnotili Studentovým *t*-testom a významnosť vplyvu skupiny na sledované parametre bol testovaný jednorozmernou analýzou rozptylu – ANOVA.

VÝSLEDKY

Dosiahnuté výsledky sú zhrnuté v tab. I a II. Vo všetkých troch skupinách teliat postihnutých rôznym

I. Hodnoty krvných plynov a acidobázickej rovnováhy pri respiračnom syndróme teliat podľa závažnosti ochorenia v porovnaní so zdravými teľatami ($\bar{x} \pm sd$) – Values of blood gases and acid-base balance in respiratory syndrome of calves according to the seriousness of disease compared with healthy calves ($\bar{x} \pm sd$)

Parameter ¹	Rsd 0 (n = 20)	Rsd 1 (n = 13)	Rsd 2 (n = 15)	Rsd 3 (n = 15)	ANOVA	
					F	p
pH (logmolc)	7,418 ± 0,015	7,406 ± 0,020	7,430 ± 0,029 ^{1x}	7,400 ± 0,041 ^{2x}	3,4	<0,05
pCO ₂ (kPa)	5,72 ± 0,27	5,77 ± 0,25	5,71 ± 0,45	7,51 ± 1,37 ^{c,1z2z}	2,5	<0,001
pO ₂ (kPa)	11,82 ± 0,71	10,37 ± 0,51 ^c	9,15 ± 0,53 ^{c,1z}	6,76 ± 1,29 ^{c,1z2z}	112,9	<0,001
SAT (%)	96,6 ± 0,6	95,2 ± 0,7 ^c	93,7 ± 1,3 ^{c,1y}	83,3 ± 9,5 ^{c,1z2z}	26,3	<0,001
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	27,9 ± 1,2	27,0 ± 2,2	28,3 ± 2,8	34,1 ± 4,3 ^{c,1z2z}	20,4	<0,001
BE (mmol/l)	3,2 ± 1,2	2,3 ± 2,2	3,7 ± 2,8	8,5 ± 3,6 ^{c,1z2z}	18,5	<0,001

c = $p < 0,001$ štatistická významnosť voči skupine zdravých teliat (Rsd 0) – $p < 0,001$ statistical significance against group of healthy animals (Rsd 0)

x, y, z = štatistická významnosť v rámci skupín teliat s respiračným syndrómom (Rsd 1, 2, 3) – statistical significance within groups with respiratory syndrome

x = $p < 0,05$

y = $p < 0,01$

z = $p < 0,001$

II. Analýza individuálnych hodnôt acidobázickej rovnováhy a krvných plynov u sledovaných skupín teliat postihnutých respiračným syndrómom – Analysis of different values of acid-base balance and blood gases in studied group of calves affected by respiratory syndrome

Parameter	Rozsah hodnôt ²	Skupina teliat ¹		
		Rsd 1 (n = 13)	Rsd 2 (n = 15)	Rsd 3 (n = 15)
pH (logmolc)	>7,440	0	7	4
	<7,360	0	0	4
pCO ₂ (kPa)	>7	0	0	7
	>8	0	0	5
	>9	0	0	3
pO ₂ (kPa)	<10	4	14	15
	<8	0	0	12
	<6	0	0	5
SAT (%)	<95	5	13	15
	<90	0	0	11
	<80	0	0	4
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	>30	0	3	12
	>35	0	0	6
	>40	0	0	3
BE (mmol/l)	>5	1	3	12
	>10	0	0	4

¹group of calves, ²range of values

stupňom respiračného syndrómu sa priemerné hodnoty pH krvi pohybovali v medziach fyziologického rozpätia a oproti skupine zdravých teliat neboli zaznamenané štatisticky významné rozdiely. Väčšia hodnota štandardnej odchýlky pH v skupine Rsd 3 však poukazuje na širšie rozpätie individuálnych hodnôt s minimom 7,335 a maximom 7,460. Pri analýze individuálnych hodnôt v skupine s ťažkým stupňom ochorenia sme v oblasti acidémie (pH < 7,360) zaznamenali štyri teľatá

a alkalémie (pH > 7,440) tiež štyri teľatá, kým ešte sedem teliat vykazovalo hodnoty v rámci referenčných hodnôt (pH = 7,360 až 7,440). Rozdiely v priemerných hodnotách sme zaznamenali medzi skupinami Rsd 1 a Rsd 2 ($p < 0,05$) a Rsd 2 a Rsd 3 ($p < 0,05$) a analýza rozptylu hodnôt preukázala významnosť vplyvu skupiny ($p < 0,05$).

Zhodnotením pCO₂ sme u skupiny Rsd 1 a Rsd 2 nezaznamenali významné rozdiely oproti skupine zdravých teliat. V skupine Rsd 3 bola priemerná hodnota takmer o 2 kPa vyššia než v ostatných skupinách a tento rozdiel bol štatisticky vysoko významný ($p < 0,001$). Uvedená skupina vykazovala takmer u polovice teliat vyššie individuálne hodnoty hodnoty ako 7 kPa a vitálne nebezpečná hranica 8 kPa (Sliana a i., 1993) bola zaznamenaná u piatich teliat skupiny Rsd 3. U skupiny Rsd 1 a Rsd 2 nebola u žiadneho zo sledovaných teliat nameraná vyššia hodnota ako 7 kPa. V rámci skupín chorých teliat významné rozdiely ($p < 0,001$) sme zaznamenali tiež medzi skupinami Rsd 1, 2 a Rsd 3.

Pri hodnotení pO₂ bol pozorovaný výrazne klesajúci trend nameraných hodnôt zodpovedajúci stupňu postihnutia respiračného aparátu. Vo všetkých troch skupinách chorých teliat boli získané hodnoty významne rozdielne oproti teľatám zdravým ($p < 0,001$). Individuálne hodnoty pO₂ pod 10 kPa boli zaznamenané u skupiny Rsd 1 v 4, Rsd 2 v 14 a Rsd 3 v 15 prípadoch. V skupine Rsd 3 všetky individuálne hodnoty boli pod 9 kPa, pričom u piatich teliat nižšie ako 6 kPa, čo sa približuje hodnotám získaným v dobre saturovanej venózne krvi. Rozdiely priemerných hodnôt boli medzi všetkými skupinami chorých teliat vysoko významné ($p < 0,001$).

Podobný trend ako u pO₂ bol zaznamenaný aj u SAT u všetkých troch skupín chorých teliat v porovnaní so skupinou zdravých teliat ($p < 0,001$). Optimálna saturácia hemoglobínu kyslíkom nad 95 % nebola dosiahnutá v skupine Rsd 1 u 5, Rsd 2 u 13 a Rsd 3 u 15 teliat. Individuálne hodnoty SAT sa medzi 90 až 95 % pohybovali v skupinách Rsd 1 a Rsd 2 u 5, resp. 13

teliat, kým v skupine Rsd 3 u všetkých teliat a v 11 prípadoch tejto skupiny až pod hranicou 90 %, s minimom 58,9 %, čo zodpovedá hodnotám dosahovaným vo venóznej krvi. Rozdiely priemerných hodnôt medzi skupinami Rsd 1 a Rsd 2 boli významné ($p < 0,01$) podobne ako aj medzi Rsd 1, 2 a Rsd 3 ($p < 0,001$).

Metabolické zložky acidobázickej rovnováhy zaznamenali u aktuálneho bikarbonátu – HCO_3^- , ako aj BE podobný trend s nevýznamnými rozdielmi priemerných hodnôt medzi skupinou zdravých teliat a Rsd 1 a Rsd 2, kým u skupiny Rsd 3 bol rozdiel nameraných hodnôt vysoko významný ($p < 0,001$). Vyššie hodnoty aktuálneho bikarbonátu než 30 mmol/l boli namerané v skupine Rsd 2 u troch teliat a Rsd 3 u 12 teliat, z čoho šesť resp. tri telatá z tejto skupiny mali hodnoty vyššie než 35 resp. 40 mmol/l. Tomu zodpovedali aj hodnoty zaznamenané pri BE v skupine Rsd 3 – u 12 resp. štyroch teliat viac ako +5 resp. +10 mmol/l. U oboch parametrov priemerné hodnoty skupiny Rsd 3 boli významne rozdielne oproti hodnotám v skupinách Rsd 1 a 2 ($p < 0,001$). Analýza rozptylov hodnôt preukázala významný vplyv skupiny u pO_2 , SAT, pCO_2 , HCO_3^- a BE ($p < 0,001$).

Celkové trendy u jednotlivých sledovaných parametrov u hodnotených skupinách chorých teliat na základe dosiahnutých výsledkov sú zhrnuté a schematicky znázornené v tab. III.

III. Trendy zmien sledovaných parametrov u teliat podľa závažnosti postihnutia respiračného aparátu – Trends of changes of studied parameters in calves according to the seriousness of affection of respiratory system

Skupina teliat ¹	pH	pCO_2	pO_2	SAT	HCO_3^-	BE
Rsd 1	–	–	–↓	–↓	–	–
Rsd 2	–↑	–	↓	↓	–↑	–↑
Rsd 3	–↑↓	↑	↓	↓	↑	↑

– = nevýznamné zmeny parametrov – insignificant changes of parameters

↑↓ = možné mierne zvýšenie, resp. zníženie hodnôt – possible slight increase or decrease of values, resp.

↑↓ = významné zvýšenie, resp. zníženie hodnôt – significant increase or decrease of values, resp.

¹ group of calves

DISKUSIA

Vysoká prevalencia chorobnosti zvierat vyžaduje neustále rozvoj a zdokonaľovanie včasnej a správnej diagnostiky, ako aj získavanie nových poznatkov v ich patogenéze. Jedným z dôležitých ukazovateľov klinicko-biochemických vyšetrení je aj acidobázické vyšetrenie krvi a stanovenie hodnôt krvných plynov. Aj keď acidobázický profil má v patogenéze chorôb teliat dominantné postavenie u metabolicky podmienených po-

rúch, nie zanedbateľné sú jeho zmeny v patogenéze infekčných chorôb, kde odchýlky acidobázy môžu proces komplikovať a zintenzívňovať. Častý výskyt respiračného syndrómu u teliat v chovoch, ktorý často postihuje 30 až 40 % stavu zvierat (Dobšinský a i., 1977; Šimko, 1983, 1989; Körtner, 1993) poukazuje na potrebu štúdia jej patogenetických vzťahov, vrátane acidobázy a krvných plynov i vzhľadom na často málo úspešné terapeutické zásahy.

Klinický obraz bronchopneumónie u teliat je napriek širokej škále možných pôsobiacich patogénov prevažne jednotný a najčastejšie sa pozorujú kašeľ, výtoky z nosa, inapetencia, zvýšenie telesnej teploty, dýšpnoe, tachypnoe a zmeny auskultačných náleзов pľúc (Thomas a i., 1975; Jensen a i., 1976; Bryson a i., 1978; Allan a i., 1978; Eltze a Selbitz, 1993). V dôsledku častej uniformity klinických príznakov dôležitou úlohou diferenciálnej diagnostiky je určenie lokalizácie ochorenia v respiračnom trakte ako aj stupňa postihnutia a intenzity priebehu ochorenia (Eltze a Selbitz, 1993).

Klinické vyšetrenie predstavuje, podobne ako v predchádzajúcom období, východiskový bod v diagnostike pľúcnych ochorení u zvierat. Adspekcia, palpácia, perkusia a auskultácia, vrátane merania telesnej teploty, umožňujú však stanoviť len symptomatickú diagnózu (Dirksen a Stöber, 1981) a odhadnúť len čiastočne vážnosť ochorenia. Neumožňujú však v dostatočnej miere posúdenie morfológických a funkčných zmien orgánov. Tento fakt vytvára predpoklad a potrebu rozšírenia uvedených vyšetrení o iné doplnujúce a špecifickejšie metódy (Bryson, 1985). Tieto zahŕňajú v sebe vyšetrenia na priamy alebo nepriamy dôkaz pôvodcov ochorení (výtery, krvné sérum, trus), vyšetrenie tracheo-bronchiálneho sekrétu, röntgenologické, endoskopické a sonografické vyšetrenie, biopsiu, funkčné vyšetrenia pľúc, monofrekvenčnú oscilometriu. Pri použití všetkých dostupných diagnostických postupov dnes existuje možnosť respiračný aparát podrobne vyšetriť a zabezpečiť tým optimálnu terapiu a zdoľovanie ochorenia (Hofmann, 1991).

V poslednom období v popredí funkčných vyšetrení pľúc hlavne u koní a hovädzieho dobytku je vyšetrenie krvných plynov arteriálnej krvi. Podľa Calderwooda (1972) analýza krvných plynov arteriálnej krvi je dôležitým prostriedkom na hodnotenie pľúcnych dysfunkcií. Viacerí autori sa prikláňajú k názoru, že predovšetkým pO_2 poskytujú najcitlivejšie hodnotenie existencie a závažnosti respiračného ochorenia (Scholz a i., 1987; Schäfer a i., 1992; Reinhold a Födisch, 1993). Tento parameter sa mení v porovnaní s druhým krvným plynom – pCO_2 už pri miernom postihnutí pľúc chorobným procesom a narušení výmeny plynov v alveolách. Okrem týchto dvoch parametrov a pH krvi sme u našich teliat doplnili vyšetrenia aj o SAT ako významného ukazovateľa nasýtenosti arteriálnej krvi kyslíkom a HCO_3^- a BE ako metabolických zložiek acidobázickej rovnováhy. Pomocou nich sme sledovali možné kompenzačné regulačné procesy v organizme ako reakciu

na predpokladané narušenie rovnováhy vnútorného prostredia v dôsledku vzniku respiračnej acidózy. Ako z našich výsledkov vyplýva, najvýraznejšie vo vzťahu k stupňu postihnutia respiračného aparátu reagoval pO_2 a SAT. Podobne, ako na to poukázali aj Currie (1985), Scholz a i. (1987) a Collie (1992) u pO_2 , zmeny korelovali s klinickým obrazom poklesom hodnôt pO_2 už pri miernom stupni ochorenia. V skupine teliat s ťažkým stupňom respiračného syndrómu približne jedna tretina zvierat dosahovala také hodnoty pO_2 , resp. SAT, ktoré sa zisťujú v dobre saturovanej venóznej krvi. Naproti tomu, pri hodnotách pCO_2 sme zaznamenali výrazné zmeny – vzostup hodnôt – až pri ťažkom stupni ochorenia. Naše výsledky korešponujú s hodnotami autorov Currie (1985) a Scholz a i. (1987), ktorí, podobne ako my, hodnotili nálezy u zvierat v skupinách podľa závažnosti ochorenia. Naproti tomu Collie (1992) a Reinhold a Födisch (1993) zaznamenali v skupine teliat postihnutých bronchopneumóniou bez ich rozdelenia podľa závažnosti ochorenia oproti zdravým tetatám popri poklese hodnôt pO_2 vyššie hodnoty pCO_2 . Vestweber a i. (1977) v skupine teliat s chronickou bronchopneumóniou zaznamenali výrazné zníženie hodnôt pO_2 , kým u pCO_2 nezaznamenali zvýšenie, avšak nesignifikantne nižšie hodnoty než u skupiny zdravých teliat odvodňujúc to ako následok tachypnoe a hyperventilácie. Pri výmene plynov v pľúcach je významná tak úroveň ventilácie každého alveolu, ako aj jej perfúzia (Trojan, 1988). Pri ochoreniach respiračného aparátu dochádza k narušeniu distribúcie vzduchu do jednotlivých alveol, ako aj perfúzie pľúcneho tkaniva krvou. Hypoventilácia porucha je spôsobená zníženou ventiláciou alveol pri súčasne dobrej perfúzii a má za následok pokles alveolárneho pO_2 a vzostup pCO_2 . Pri hypoperfúzných poruchách dochádza k obmedzeniu až zastaveniu prúdenia krvi a v takýchto postihnutých oblastiach pľúc nemôže prebiehať normálna výmena plynov alveolokapilárnu membránou ani vtedy, keď sú alveoly dostatočne ventilované vzduchom. Ak podobný stav postihne rozsiahlejšie oblasti pľúcneho kapilárneho riečiska, dochádza k výrazným zmenám celkového ventilačno-perfúzneho pomeru. K zmenám v obsahu O_2 a CO_2 arteriálnej krvi môžu viesť aj venózo-arteriálne (pravo-ľavé) skraty (Trojan, 1988), ktoré pri chorobných stavoch v pľúcach môžu zvýšiť podiel prímery venóznej krvi (nižšie pO_2 a vyššie pCO_2) a ovplyvniť tak v konečnom dôsledku namerané hodnoty pO_2 a pCO_2 vo vyšetrovanej arteriálnej krvi. Okrem toho uvedené rozdielne trendy v dynamike hodnôt krvných plynov vyplývajú aj z rozdielnej difúzneho kapacity pľúc pre CO_2 a O_2 , ktorá je pre oxid uhličitý asi 20x väčšia než pre kyslík, a preto sa CO_2 , na rozdiel od O_2 , nereťnuje v organizme ani pri alveolárno-kapilárnom bloku (Trojan, 1988). Aj keď pO_2 nie vždy priamo koreluje s klinickým obrazom ochorenia, predstavuje významný ukazovateľ miery porúch difúzneho kapacity pľúc a tým aj čiastočne miery postihnutia pľúcneho parenchýmu (Scholz a i., 1987). Zmeny len v hodnotách pO_2 bez zvýšenia pCO_2 sú definované ako parciálna respiračná

insuficiencia. V prípade výraznejších porúch alveolárnej ventilácie s vzostupom hodnôt aj pCO_2 hovoríme už o globálnej respiračnej insuficiencii (Deegen, 1983).

Ako vyplýva z hodnotenia pH, dosiahnuté výsledky ani v jednej zo skupín chorých teliat nevykazujú významný trend k acidémii až na štyri tetatá v skupine Rsd 3. Aj keď u teliat s najťažším postihnutím vyžaduje pCO_2 zvýšené hodnoty – trend k respiračnej acidóze, hodnoty pH krvi trend poklesu hodnôt nezaznamenali. Obdobné výsledky dosiahli aj Luitjens (1990) a Collie (1992). Aj keď Vestweber a i. (1977) zistili u bronchopneumonických teliat v priemere nižšie hodnoty pH oproti zdravým jedincom, avšak tieto sa pohybovali ešte v rámci fyziologických hodnôt. Udržiavanie pH krvi v rámci fyziologických hodnôt aj u teliat s respiračnou acidózou (zvýšené hodnoty pCO_2 až na 7 až 9 kPa) možno dať do súvisu s pôsobením a účinnosťou regulačných (kompenzačných) mechanizmov organizmu, pufráčnych systémov, hlavne CO_2 – bikarbonát, ktoré v rámci možnosti kompenzujú vzniknuté narušenie rovnováhy vnútorného prostredia organizmu. Je to prejav reakcie organizmu na vzniknutú respiračnú acidózu, a to pomocou renálneho systému zvýšením vylučovania vodíkových iónov a zadržaním bikarbonátových iónov v organizme. Jeho výsledkom je korekcia acidobázickej rovnováhy – pH krvi zvýšením hodnôt bikarbonátov a BE (Nejedlý, 1974). Nástup kompenzácie porúch acidobázickej rovnováhy pri vzniknutej respiračnej poruche je pomalší a trvá niekoľko hodín až dní oproti kompenzácií respiračnej pri poruche metabolickej (Deegen, 1983). Prejav kompenzácie respiračnej acidózy sa v našom prípade prejavil hlavne u skupiny s ťažkým postihnutím respiračného aparátu (Rsd 3), kde napriek vysokým hodnotám pCO_2 , až na štyri tetatá s miernym poklesom pH krvi pod 7,36, sme u ostatných zistili pH v rámci fyziologických hodnôt, resp. mierne s trendom až do alkalémie. Tejto dynamike zodpovedajú hodnoty HCO_3^- a BE s nameranými vyššími hodnotami u teliat skupiny Rsd 3 a daný stav je hodnotený ako kompenzovaná respiračná acidóza. Podobné trendy vo svojich prácach zaznamenali aj Currie (1985), Verhoeff a i. (1985) a Luitjens (1990).

Hodnotenie nami sledovaných ukazovateľov preukázalo, že pri ochoreniach respiračného aparátu predstava popri základných klinických vyšetrovaniach analýza krvných plynov – pO_2 , a pCO_2 , významné parametre poukazujúce na poruchu ventilačnú a perfúzných pomerov. Nemenej významnými sú aj ďalšie hodnotené parametre – pH, HCO_3^- a BE, u ktorých boli zistené taktiež významné trendy vo vzťahu k závažnosti ochorenia.

LITERATÚRA

ALLAN, E. M. – OBI, T. V. – WISEMAN, A. – CORNWELL, H. J. C. – SELMAN, I. E. – MSOLLA, P. M. – PIRIE, H. M. (1978): The isolation of *Mycoplasma bovis* from pneumonic calves in Scotland. Vet. Rec., 103, 139.

- BREAZILE, J. E. (1988): The physiology of stress and its relationship to mechanisms of disease and therapeutics. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.*, **4**, 441-480.
- BRYSON, D. G. – MCFERRAN, J. B. – BALL, H. J. – NEILL, S. D. (1978): Observations on outbreaks of respiratory disease in housed calves. 1. Epidemiological, clinical and microbiological findings. *Vet. Rec.*, **103**, 485-489.
- BRYSON, D. G. (1985): Calf pneumonia. *Vet. Clin. N. Am.-Food Anim. Pract.*, **1**, 237-257.
- CALDERWOOD, H. W. (1972): Clinical application of blood gas analysis and pH measurements in veterinary practice. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.*, **8**, 444-447.
- COLLIE, D. D. S. (1992): Pulmonary function changes and clinical findings associated with chronic respiratory disease in calves. *Br. Vet. J.*, **148**, 33-40.
- Currle, M. (1985): Endoskopische, tracheobronchialesekretozytologische und arterielle Blutgasuntersuchungen bei bronchopneumoniekranken Rindern. [Inaugural Dissertation.] Hannover.
- DOBŠINSKÝ, O. – KUBÍN, I. – ITZE, L. – JÍLEK, F. (1977): Úhyny telat ve vybraných velkokapacitních teletnicích. In: Zbor. Ref. III. pracovný seminár o produkcií, zdraví a chorobnosti teliat v priemyselných podmienkach chovu. Košice, s. 153-158.
- DEEGEN, E. (1983): Beurteilung von Blutgasparametern des arteriellen Blutes bei Pferden mit respiratorischen und metabolischen Störungen. *Prakt. Tierarzt*, **65**, Coll. Vet. XIV, 128-132.
- DIRKSEN, G. – STÖBER, M. (1981): Ursachen von Misserfolgen bei der Behandlung der Enzootischen Bronchopneumonie des Rindes. *Prakt. Tierarzt*, **63**, Coll. Vet. XII, 104-112.
- ELTZE, K. – SELBITZ, H. J. (1993): Zur Differentialdiagnostik sowie Therapie und Prophylaxe respiratorischer Erkrankungen des Kalbes. *Tierärztl. Umsch.*, **48**, 581-587.
- HOFMANN, W. (1991): Diagnostik von Atemwegserkrankungen. *Prakt. Tierärztl.*, **72**, Coll. Vet. XXII, 29-32.
- JENSEN, R. – PERSON, R. E. – BRADDY, P. M. – SAARI, D. A. – LAUERMAN, L. H. – ENGLAND, J. J. – KEYVANFAR, H. – COLLIER, J. R. – HORTON, D. P. – MC CHESNEY, A. E. – BENITEZ, A. – CHRISTIE, R. M. (1976): Shipping fever pneumonia in yearling feedlot cattle. *Am. Vet. Med. Assoc.*, **169**, 500-506.
- KÖRNER, O. (1993): Dokumentation und Auswertung der tierärztlichen Betreuung von Bullenmastbeständen unter besonderer Berücksichtigung ökonomischer Aspekte. [Inaugural Dissertation.] Hannover.
- LUITJENS, B. (1990): Untersuchungen zu Ätiologie und Therapie bronchopneumonischer Erkrankungen bei Kälbern und Jungrindern. [Inaugural Dissertation.] Hannover.
- MICHNA, A. (1978): Štúdium mechanizmu dehydratačného syndrómu pri enteritidach teliat. [Habilitationárna práca.] Košice, Univerzita veterinárskeho lekárstva. 146 s.
- MUDROŇ, P. – KOVÁČ, G. – BAJOVÁ, V. – PISTL, J. – CHOMA, J. – BARTKO, P. (1994): Effect of vitamin E on some leucotic parameters and functions in transported calves. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **101**, 47-49.
- MUDROŇ, P. – KOVÁČ, G. – BARTKO, P. – CHOMA, J. – ZEŽULA, I. (1996): Effect of vitamin E on cortisol, lactate and acid-base balance in transported calves. *Vet. Med. – Czech*, **41**, 71-76.
- NEJEDLÝ, B. (1974): Vnitřní prostředí, klinická biochemie a praxe. Praha, Avicenum. 248 s.
- REINHOLD, P. – FÖDISCH, G. (1993): Lungenfunktionsdiagnostik bei gesunden und an Pneumonie erkrankten Kälbern. *Mh. Vet.-Med.*, **48**, 113-117.
- ROSENBERGER, G. (1990): Die klinische Untersuchung des Rindes. Berlin, Hamburg, Verlag Paul Parey, 718 s.
- SCHÄFER, M. – PAENTZER, S. – UHLING, A. (1992): Klinische Formen der enzootischen Pneumonie bei Kälbern und ihre Auswirkungen auf die Atmung. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **99**, 200-204.
- SCHOLZ, H. – CURRLE, M. – FISCHER, W. (1987): Untersuchungen zur Bronchopneumonie des Rindes. 2. Mitteilung: Endoskopische, Tracheobronchialesekre- und Blutgasuntersuchungen. *Tierärztl. Umsch.*, **42**, 371-378.
- SLANINA, L. (1991): Zdravie a produkcia teliat. Bratislava, Príroda. 387 s.
- SLANINA, L. (1993): Veterinárna klinická diagnostika vnútorných chorôb. Bratislava, Príroda. 389 s.
- SLANINA, L. – NAGY, O. – SEDOVIČ, M. (1993): Acid-base disorders in calves in connection to nosologic units. *Slov. Vet. Čas.*, **18**, 15-20.
- ŠIMKO, Š. (1983): Dynamika chorôb dýchacích orgánov teliat. *Veterinárstvi*, **33**, 11-12.
- ŠIMKO, Š. (1989): Epizootologické zhodnotenie účinku kombinácie tylozínu a sulfamidínu pri terapii respiračného syndrómu teliat. *Veterinárstvi*, **39**, 302-304.
- THOMAS, L. H. – HOWARD, C. J. – GOURLAY, R. N. (1975): Isolation of *Mycoplasma agalactiae* var. *bovis* from a calf pneumonia outbreak in the south of England. *Vet. Rec.*, **97**, 55-56.
- TROJAN, S. a kol. (1988): Fyziologie. 1. část. Praha, Avicenum. 565 s.
- VERHOEFF, J. – WIERDA, A. – VAN NIEUWSTADT, A. P. – BUITELAAR, J. W. (1985): Spontaneous bovine respiratory syncytial virus infections in calves: Arterial blood gas, pH and bicarbonate values. *Vet. Rec.*, **117**, 202-204.
- VESTWEBER, G. E. – GUFFY, M. – KELLY, B. – LEIPOLD, H. W. (1977): Chronic bronchopneumonia in cattle. *Bov. Pract.*, **12**, 55-62.

Received: 97-08-08

Accepted after corrections: 97-11-27

Kontaktná adresa:

MVDr. Oskar Nagy, Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 95 633 21 11-15, fax +421 095 632 36 66

A DENSITOMETRIC ANALYSIS OF ALKALINE PHOSPHATASE AND AMINOPEPTIDASE M IN THE JEJUNUM ENTEROCYTES OF THE PIGLETS WITH RETARDED GROWTH

DENZITOMETRICKÁ ANALÝZA ALKALICKEJ FOSFATÁZY A AMINOPEPTIDÁZY M V ENTEROCYTOCH TENKÉHO ČREVA Odstavčiat zostávajúcich v raste

L. Lenhardt, E. Dudriková

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: The activity of alkaline phosphatase and aminopeptidase M in the jejunum enterocytes was determined in 3 month old clinically healthy piglets with normal (12 animals, average body weight 30.7 kg) and retarded growth (12 animals, average body weight 16.9 kg). A densitometric analysis was used. A marked decrease in an average density of the alkaline phosphatase – Dx 51.3 as well as in the density/area ratio – DAx 1.48 was observed in the animals with retarded growth. This was in contrast with the results from weaned piglets with normal growth – Dx 94.7 and DAx 2.33, respectively. Similar results were observed during evaluation of aminopeptidase M (Dx 35.2 and DAx 1.05 versus Dx 81.62 and DAx 2.12, respectively). The obtained results point to a relationship between the amount of the investigated enzymes found in the microvillous zone of enterocytes and the functional state of enterocytes. These data can be used in the diagnose of the growth disturbances in weaned piglets.

alkaline phosphatase; aminopeptidase M; densitometric analysis; enterocytes; piglets

ABSTRAKT: Cieľom práce bolo stanoviť metódou denzitometrickej analýzy aktivitu alkalikkej fosfatázy a aminopeptidázy M v enterocytoch tenkého čreva u dvanástich trojmesačných, klinicky zdravých odstavčiat s normálnym rastom – kontrolná skupina (priemerná živá hmotnosť 30,7 kg) a odstavčiat zaostávajúcich v raste (12 ks zvierat, priemerná živá hmotnosť 16,9 kg). V kontrolnej skupine zvierat bol reakčný produkt alkalikkej fosfatázy deponovaný v mikrovilóznej zóne enterocytov, kde bola evidentná jeho veľmi silná aktivita (DX 94,7; DAX 2,33). U zvierat zaostávajúcich v raste sa v sliznici tenkého čreva prezentovala aktivita alkalikkej fosfatázy výrazným znížením (Dx 51,3; DAX 1,48). Podobné výsledky sme zaznamenali aj v aktivite aminopeptidázy M (Dx 81,62 a DAX 2,12 oproti Dx 35,2 a DAX 1,05). Dosiahnuté výsledky poukázali na vzťah medzi množstvom sledovaných enzýmov pozorovaných v mikrovilóznej zóne enterocytov a ich funkčným stavom. Výsledky tejto práce poukazujú na možnosť využitia denzitometrickej analýzy pri diagnostike zmien enzymatického vybavenia enterocytov u odstavčiat zaostávajúcich v raste.

alkalická fosfatáza; aminopeptidáza M; denzitometrická analýza; enterocyty

INTRODUCTION

Failure of absorption of nutrients from the intestinal tract results in clinical manifestations, generally called malabsorption syndrome. The clinical signs most evident in man and animals are persistent gastrointestinal upset (vomiting, diarrhea), change in eating habits, loss in weight, and steatorrhea (in some cases).

Lesions found in the small intestine include villous atrophy; the villi are shortened due to loss of epithelium and broadened due to infiltration of leukocytes into the lamina propria.

The brush border of enterocytes contains many hydrolytic enzymes (disaccharidases, peptidases, and phosphatases) as well as nonenzymatic proteins, etc.

(Jones and Hunt, 1983). The alkaline phosphatase is found primarily in cell membranes where active transport passes take place, e.g. in the brush border of enterocytes (Loida, 1974). Its significance is indicated by its presence in the digestive tract during embryonal development or during postnatal period (Kudweis and Loida, 1989a, b). Importance in the overall metabolism of alkaline phosphatase is related to its role in the absorption of fats (Linsheer et al., 1971).

Aminopeptidase M hydrolyzes various peptides and arylamides. The aminopeptidase M that hydrolyzes L-leucyl- and L-alanyl-2-naphtyl-amide or -p-nitrophenylanilide and L-leucyl-3-indolizamide is found mainly in the brush border of enterocytes and cells of the renal proximal tubules (Loida et al., 1979).

The aim of this study was to determine the activity of alkaline phosphatase and aminopeptidase M in the jejunum enterocytes in piglets with retarded growth by a densitometric analysis.

MATERIAL AND METHODS

Twenty four 3 month old Slovak White x Landrace crossbreds weaned piglets maintained on a large-capacity farm in Košická Polianka were used in this study. The animals showed no clinical symptoms of sickness and had negative bacteriological findings. The animals were divided into two groups per 12 animals. The first group (control group) consisted of clinically healthy, weaned piglets with normal growth (mean body weight 30.7 kg). Weaned piglets with retarded growth (mean body weight 16.9 kg) were included into the 2nd group.

After the piglets had been sacrificed by the jugular incision, samples were taken from the jejunum, namely 250 cm from *ostium ileoocaecale*, and frozen in cold petroleum ether at -20°C . Cryostat sections (thickness $7\ \mu\text{m}$) were cut on a cryostat (Cryocut 27 000) at a cabinet temperature -21°C . Sections were picked up onto clean glass slides (0.96 to 1.06 mm of thickness) and stored in the cryostat cabinet until used. The cryostat sections were allowed to dry for 5 min at 37°C and incubated for alkaline phosphatase (AP) and aminopeptidase M (AMP M) activity, respectively.

The incubation for AP activity was performed according to L o j d a et al. (1979). The medium consisted of veronal acetate buffer (pH 9.2) and naphthol-AS-MX phosphate (Fluka, Germany), and stable diazonium salt Fast Blue BB (Sigma, USA). The incubation lasted for less than 10 min at 37°C . Control incubations were performed in the presence of the inhibitor, namely L-cystein.

The reaction for AMP M activity was based on the method of L o j d a et al. (1979). The incubation was performed for 25 min at 37°C in cacodylate buffer (pH 7.0) and L-Ala-4-methoxy-2-naphtylamid (Sigma, USA), and stable diazonium salt Fast Blue BB (Sigma, USA). Control incubations were performed in the presence of the inhibitor, namely 1, 10-phenanthroline.

After incubation, the sections were rinsed with distilled water in order to stop the reaction immediately. Postfixation of the sections was performed in a solution of 4% (v/v) formaldehyde for 10 h at a room temperature. The sections were rinsed in distilled water and mounted in glycerin jelly.

The activity of AP and AMP M was evaluated by means of an integrating microdensitometer Vickers-M-86 using an objective 20x and diaphragm No. 2 (diameter $2\ \mu\text{m}$). The measurements of the reaction product were taken at a wavelength of 480 nm.

The density of the enzymes investigated was determined in 5 jejunum sections from each of the piglets in 10 intestinal villi and 10 sites corresponding to the enterocyte location. The data obtained were used to determine the average area (A), the average density of reaction product (Dx), and the density/area ratio (DAX).

Microdensitometric evaluation was carried out at Parasitological Institute in České Budějovice, Czech Republic.

RESULTS

A uniform distribution of alkaline phosphatase activity in terms of its location and magnitude was observed in the microvillous zone of healthy weaned piglets from the group with the normal growth. They exhibited considerably higher AP activity (Fig. 1) in comparison with the piglets with retarded growth (Fig. 2). The mic-



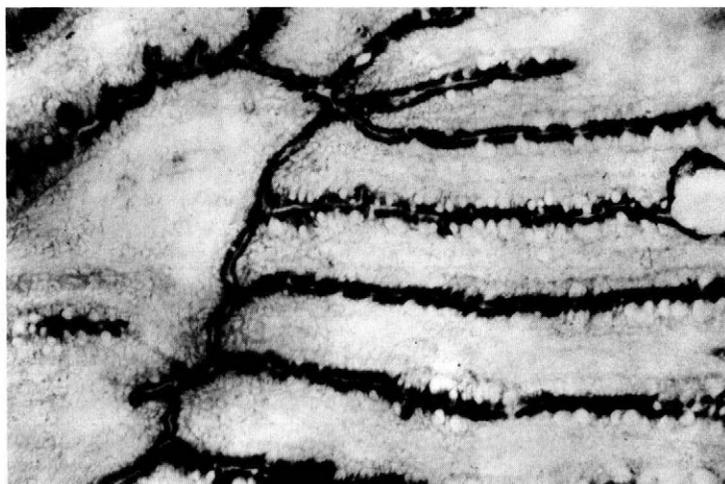
1. The activity of alkaline phosphatase in a microvillous zone of jejunum enterocytes in clinically healthy weaned piglets with normal growth (obj. 10, diaphragm 6.3)

rodensitometric evaluation of AP activity is summarized in Tab. I. Only weak activity of this enzyme was observed on the crypts level.

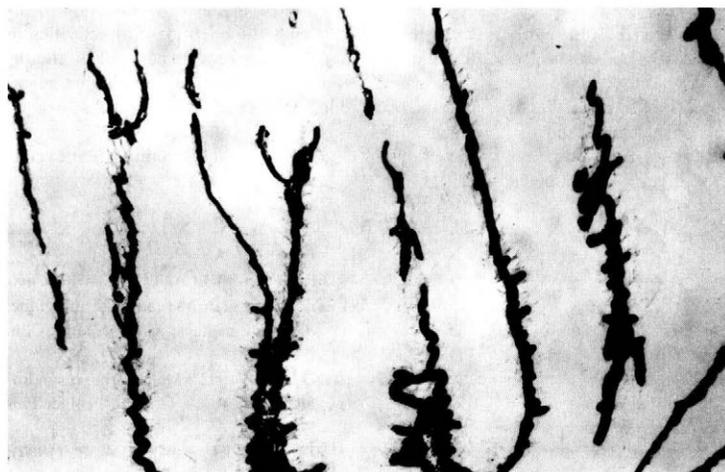
Microvilli of enterocytes in healthy weaned piglets from the group with the normal growth examined showed also uniform very high staining of aminopeptidase M. Reaction product of this enzyme was observed in a healthy mucous membrane of the small intestine where it was presented in a very high activity (Fig. 3). In the intestinal crypts AMP M was detected in mild to high

up activity in comparison with the piglets with retarded growth. Goblet cells did not react (Fig. 4). Tab. II summarizes the results of the microdensitometric evaluation of AMP M.

Taking into consideration the values of average density Dx, area and the density/area ratio in the animals with normal growth, a considerable decrease in the microdensitometric parameters of both examined enzymes activities was observed in the animals with retarded growth.



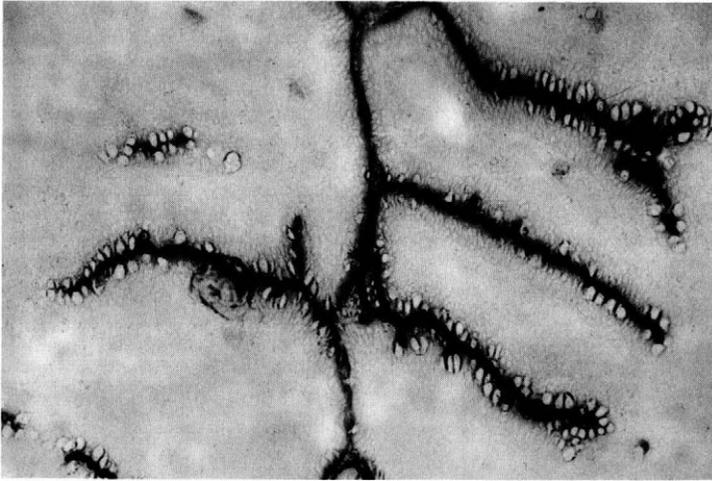
2. The activity of alkaline phosphatase in a microvillous zone of jejunum enterocytes in clinically healthy weaned piglets with retarded growth (obj. 10, diaphragm 6.3)



3. A histochemical picture of the activity of aminopeptidase M in a microvillous zone of jejunum enterocytes in clinically healthy weaned piglets with retarded growth (obj. 10, diaphragm 6.3)

I. Microdensity of jejunum enterocytes in weaned piglets with normal and retarded growth

Enzyme	Piglets with growth	Area $\bar{x} \pm SD$	Dx $\bar{x} \pm SD$	DAx $\bar{x} \pm SD$
Alkaline phosphatase	normal	37.75 \pm 1.86	86.34 \pm 3.36	2.29 \pm 0.08
	retarded	33.09 \pm 3.31	32.94 \pm 1.82	1.00 \pm 0.09



4. The mild to high up activity of aminopeptidase M in the intestinal crypts of clinically healthy weaned piglets with retarded growth. Goblet cells did not react (obj. 10, diaphragm 6.3)

II. Microdensity of jejunum enterocytes in weaned piglets with normal and retarded growth

Enzyme	Piglets with growth	Area $\bar{x} \pm SD$	Dx $\bar{x} \pm SD$	DAX $\bar{x} \pm SD$
Aminopeptidase M	normal	38.52 \pm 1.61	81.62 \pm 3.11	2.12 \pm 0.06
	retarded	33.74 \pm 2.41	35.2 \pm 2.72	1.05 \pm 0.08

DISCUSSION

Malabsorption syndromes usually result from short atrophic intestinal villi with flattened epithelium at the surface, a lesion that may be caused by many etiological factors (Thompson, 1984). Lojda (1969) observed subtotal to total atrophy of villi and at an electronmicroscopic level, he also observed defects in the microvillous zone of enterocytes. This suggests, that by comparing with the morphometric changes, reflecting the decrease in the overall absorption area, in greater detail the functional state in the digestive tract at the level of enterocytes is detected.

The results obtained in our experiments on weaned piglets with normal growth, point to a high activity of alkaline phosphatase which is in agreement with the results obtained by Kudweis and Lojda (1989a, b) using the semiquantitative and quantitative methods. A decreased alkaline phosphatase activity was recorded in piglets with retarded growth. These results are similar to those obtained from piglets with spontaneous and experimental viral, bacterial, and protozoal enteritis (Bodic et al., 1978; Kudweis et al., 1987; Kudweis and Lojda, 1989b).

Aminopeptidase M is the enzyme of the microvillous zone of enterocytes. It was observed a decrease of activity of this enzyme in the coeliac sprue in the small intestine (Lojda and Frič, 1964). Similar results were detected during experimental enteritis caused by virus IGO (Marcanik, 1980; Lojda, 1983). It seems that deficiency of aminopeptidase M

causes decreasing ability to break down shorter peptides, thus total deficiency of digestion and absorption can be observed. Disturbance of the functional state of the digestive tract, accompanied by malabsorption and body weight decrease, occur during a reduction of alkaline phosphatase and aminopeptidase M activities in the microvillous zone of enterocytes caused by the disease mentioned above. The decrease of alkaline phosphatase and aminopeptidase M activities in our experiment allows to assume a similar degree of functional conditions in the digestive tract in animals with retarded growth.

REFERENCES

- BODIC, M. F. – BARBÉ, P. – FRELAND, C. (1978): *Campylobacter pylori* et muqueuse gastrique: etude histologique, bacteriologique dans la region nentaise. Gastroenterol. Clin. Biol., 11, 543–549.
- JONES, T. C. – HUNT, R. D. (1983): Malabsorption syndrome. In: Veterinary Pathology. 5th ed. Lea and Febiger Philadelphia, pp. 1392–1394.
- KUDWEIS, M. – VÍTOVEC, J. – KOUDELA, B. (1987): Some histochemical findings on the intestinal mucosa of piglets during experimental infection with coccidia of *Eimeria scabra*. Histochem. J., 19, 615–616.
- KUDWEIS, M. – LOJDA, Z. (1989a): The small intestines histochemistry of suckling piglets. Physiol. Bohemoslov., 38, 546.
- KUDWEIS, M. – LOJDA, Z. (1989b): The small intestines histochemistry of suckling piglets in the early postnatal development. Folia Facult. Med., 66, 60.

- LINSHEER, W. G. – MELAGELADA, J. R. – FICHMAN, W. H. (1971): Diminished oleic acid absorption by L-phenylalanine inhibition of an intestinal phosphohydrolase. *Nature New Biol.*, 231, 116–117.
- LOJDA, Z. (1969): The histochemistry and electron microscopy of the small intestine with malabsorption syndrome. In: FRÍČ, P. et al.: *Malabsorption Syndrome (in Czech)*. Praha, SZN, pp. 108–115.
- LOJDA, Z. (1974): Cytochemistry of enterocytes and other cells in the mucous membrane of the small intestine. In: SMYTH, D. H.: *Intestinal Absorption*. London, New York, Plenum Press, pp. 43–122.
- LOJDA, Z. (1983b): Malabsorption. In: FILIPE, M. – LUKE, B. D.: *Histochemistry in Pathology*. Edinburgh, London, Melbourne, New York, Churchill-Livingstone, pp. 136–144.
- LOJDA, Z. – FRÍČ, P. (1964a): Histochemical study of jejunal biopsies in malabsorption syndromes. In: SCHIEBLER, T. H. – PEARCE, A. G. E. – WOLF, H. H.: *Second International Congress of Histo- and Cytochemistry*. Springer Verlag, 204 pp.
- LOJDA, Z. – GOSSRAU, R. – SCHIEBLER, T. N. (1979): *Enzyme Histochemistry. A Laboratory Manual*. Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 339 pp.
- MARCANÍK, J. (1980): *Enzyme histochemistry in some alternative processes in the veterinary pathology (in Slovak)*. [PhD Thesis.] Košice, University of Veterinary Medicine, pp. 70–86.
- THOMPSON, R. G. (1984): Atrophy. In: *General Veterinary Pathology*. 2nd ed. Philadelphia, London, Toronto, Mexico City, Rio de Janeiro, Sydney, Tokyo, W. B. Saunders Comp., pp. 283–287.

Received: 97–11–06

Accepted after corrections: 97–12–23

Contact Address:

Doc. MVDr. Ludovít Lenhardt, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika

Tel. +421 95 622 99 24, fax +421 95 632 66 66, e-mail: dudrik@vsvnov.uvm.sk

**Nejčerstvější informace o časopiseckých článcích
poskytuje automatizovaný systém**

Current Contents

na disketách

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna odebírá časopis „**Current Contents**“ řadu „**Agriculture, Biology and Environmental Sciences**“ a řadu „**Life Sciences**“ na disketách. Řada „Agriculture, Biology and Environmental Sciences“ je od roku 1994 k dispozici i s abstrakty. Obě tyto řady vycházejí 52krát ročně a zahrnují všechny významné časopisy a pokračovací sborníky z uvedených oborů.

Uložení informací z Current Contents na disketách umožňuje nejrozmanitější referenční služby z prakticky nejčerstvějších literárních pramenů, neboť báze dat je **doplňována každý týden** a neprodleně expedována odběratelům. V systému si lze nejen prohlížet jednotlivá čísla Current Contents, ale po přesném nadefinování sledovaného profilu je možné adresně vyhledávat informace, tisknout je nebo kopírovat na disketu s možností dalšího zpracování na vlastním počítači. Systém umožňuje i tisk žádanek o separát apod. Kumulované vyhledávání v šesti číslech Current Contents najednou velice urychluje rešeršní práci.

Přístup k informacím Current Contents je umožněn dvojím způsobem:

- 1) Zakázkový přístup** – po vyplnění příslušného zakázkového listu (objednávky) je vhodný především pro mimopražské zájemce.

Finanční podmínky: – použití PC – 15 Kč za každou započatou půlhodinu

- odborná obsluha – 10 Kč za 10 minut práce
- vytištění rešerše – 1 Kč za 1 stranu A4
- žádanky o separát – 1 Kč za 1 kus
- poštovné + režijní poplatek 15 %

- 2) „Self-service“** – samoobslužná práce na osobním počítači v ÚZLK.

Finanční podmínky jsou obdobné. Vzhledem k tomu, že si uživatel zpracovává rešerši sám, je to maximálně úsporné. (Do kalkulace cen nezapočítáváme cenu programu a databáze Current Contents.)

V případě Vašeho zájmu o tyto služby se obraťte na adresu:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna

Dr. Bartošová

Slezská 7

120 56 Praha 2

Tel.: 02/24 25 79 39, l. 520, fax: 02/24 25 39 38

Na této adrese obdržíte bližší informace a získáte formuláře pro objednávku zakázkové služby. V případě „self-servisu“ je vhodné se předem telefonicky objednat. V případě zájmu je možné si objednat i průběžné sledování profilu (cena se podle složitosti zadání pohybuje čtvrtletně kolem 100 až 150 Kč).

AN ULTRASTRUCTURE OF CELL DEATH IN A PIG MELANOMA

ULTRAŠTRUKTÚRA BUNKOVEJ SMRTI U MELANÓMU OŠÍPANEJ

M. Levkut, L. Kolodzieyski, O. E. Abdouislam, Z. Ševčíková, V. Ledecký, M. Zibrín

University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic

ABSTRACT: A form of cell death was studied electronmicroscopically in the regressive stage of 4 pigs melanoma. Basically, four types of cells were found: macrophages, large granular lymphocytes, melanocytes, and melanophages. Morphological changes in cell death were most frequently observed in the cytoplasm of tumour cells, in the form of dilatation of granular endoplasmic reticulum and/or vacuolation of cytoplasm close to the cell surface together with crater-like cavities. Rarely, condensation and margination of nuclear chromatin were observed without lesions in the cytoplasm. The above lesions are typical signs of cells undergoing apoptosis.

apoptosis; pigs; melanoma; electron microscopy

ABSTRAKT: V regresívnom štádiu rastu melanómu u štyroch kusov ošipanej sme elektrónovo mikroskopicky študovali formy odumierania nádorových buniek. V nádorovom tkanive sme pozorovali štyri typy buniek: makrofágy, veľké granulórné lymfocyty, melanocyty a melanofágy. Morfológické zmeny bunkovej smrti boli najčastejšie pozorované v cytoplazme nádorových buniek. Tieto boli pozorované vo forme dilatácie granulórneho endoplazmatického retikula, alebo vo forme vakuolizácie cytoplazmy pri bunkovom povrchu, spolu so vznikom dutín podobných kráterom. Vyššie popísané lézie sú typickými príznakmi buniek podliehajúcich apoptóze.

apoptóza; ošipaná; melanóm; elektrónová mikroskopia

INTRODUCTION

Melanomas of pigs as congenital lesions occur sporadically in some breeds at all ages. A remarkable feature of such tumours is the high prevalence of spontaneous regression. This phenomenon is often used as a melanoma model in human medicine (Richardson and Misfeldt, 1989). Regression of melanomas is associated with cell death (Levkut et al., 1995).

Two forms of cell death have been described in vertebrate tissue (Cohen, 1993): necrosis which is sometimes referred to as accidental cell death, and apoptosis. The latter is a form of cell death in which the process is more subtle. Apoptosis has been defined on the basis of its morphology. It has been broken down into a series of steps including condensation of the chromatin about the nuclear membrane, shrinkage of cytoplasm, and fragmentation of the affected cell into apoptotic bodies. The organelles within the dying cell remain well preserved until heterophagic digestion, after phagocytosis of apoptotic bodies and dying cells by macrophages or neighbouring cells (Ueda and Shah, 1994).

Apoptosis is associated with a wide range of pathological states such as viral infection (Lam et al., 1995), irradiation (Lowe et al., 1993) and neoplasm (Trauth et al., 1989). In tumours, apoptosis and regression of neoplastic tissue can be induced by cytostatic drugs or irradiation. In endocrine-dependent neoplasia, apoptosis is induced by the withdrawal of

trophic hormones or the administration of hormone antagonists (Bursch et al., 1992; Dive et al., 1992). Tumours rarely regress without treatment.

Apoptosis plays an important role in cell-mediated immunity. Many methods have been developed for the detection of apoptosis. Electron microscopy is one of the most sensitive morphological methods. The data presented in this report illustrate the form of cell death in spontaneously regressive pig melanoma.

MATERIAL AND METHODS

Melanomas

Four piglets with melanomas were obtained from each of three successive litters from one artificially mated Duroc and Slovak White crossbred sow. The melanomas were located at various sites, including the dorsal region, neck, and legs. The melanomas were extirpated surgically from piglets aged 19–22 days in all three litters. One melanoma came from a piglet (second litter) aged 90 days.

Light and electron microscopy

Samples for light microscopy were fixed in 10% neutral formalin and embedded in paraffin wax. Sections 5 to 6 μm thick were stained with hematoxylin-eosin.

For electron microscopy small pieces of melanoma tissue were immersed in a mixture of glutaraldehyde 2.5% and paraformaldehyde 2% in 0.1M cacodylate buffer (pH 7.2) immediately after excision. Samples were postfixed in 1.0% OsO₄, dehydrated in increasing concentration of ethanol, and embedded in Durcupan. Semi-thin sections stained with 0.5 % toluidine blue were examined by light microscopy and ultrathin sections were examined in an electron microscope (JEOL 1200 MX) with an accelerating voltage of 80 kV.

RESULTS

The melanomas were single/multiple on the skin of the piglets studied. At the time of birth, they were 1–2 cm in diameter. The melanomas increased in size with age.

Histologically, the tumorous cells in the progressive period (days 19–22 after birth) were mostly polygonal in shape, well pigmented, and central in position. However on the periphery of the main tumour mass, non-pigmented tumorous cells were present. Both types of cells gave a positive reaction with melanoma HMB45 antibody (Levkut et al., 1995). The tumorous cells exhibited many mitoses, some of abnormal type in this period. In the regressive period (day 90 after birth) spindle-like melanocytes without mitotic figures were seen.

Basically electron microscopy revealed four types of cells present in melanomas; macrophages, large granular lymphocytes, melanocytes, and melanophages. Plasma cells were observed occasionally. Macrophages with increased endoplasmic reticulum contained vacu-

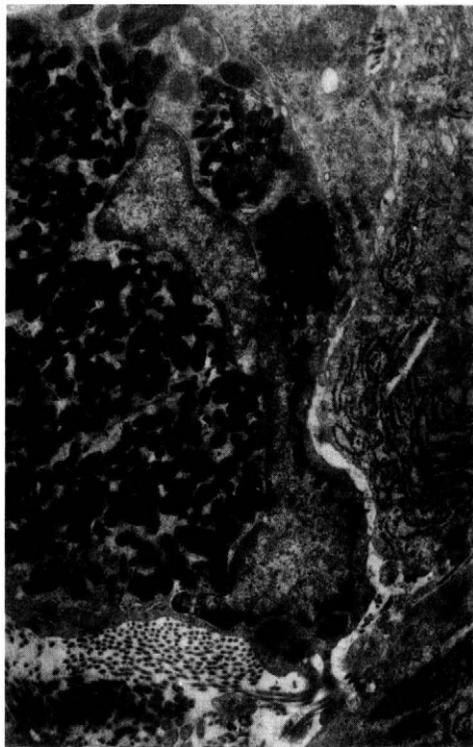
oles filled with degraded melanin and ingested collagen microfibrils (Fig. 1). Large granular lymphocytes contained electron-dense cytoplasmic granules and less round nuclei when compared to non-large granular lymphocytes. Many macrophages/large granular lymphocytes were engaged a melanophage or melanocyte. In the progressive stage, melanophages and melanocytes have largely cytoplasmic organelles including nuclei intact (Fig. 2).

In the regressive stage, morphological changes in cell death were preferentially observed in the cytoplasm of tumour cells. Some melanocytes/melanophages showed the characteristic features of cell death within the nucleus, without alteration in the cytoplasm. At this stage the changes in the cell cytoplasm are characterized by dilatation of mostly granular endoplasmic reticulum (Fig. 3). Other cells showed vacuolation of cytoplasm close to cell surface together with crater-like cavities (Fig. 4). Two types of vacuoles could be seen; optically empty or with residual bodies which were mostly round (Fig. 5). On the periphery of tumour cells apoptotic fragments predominantly cytoplasmic often bound to the membrane were seen (Fig. 6).

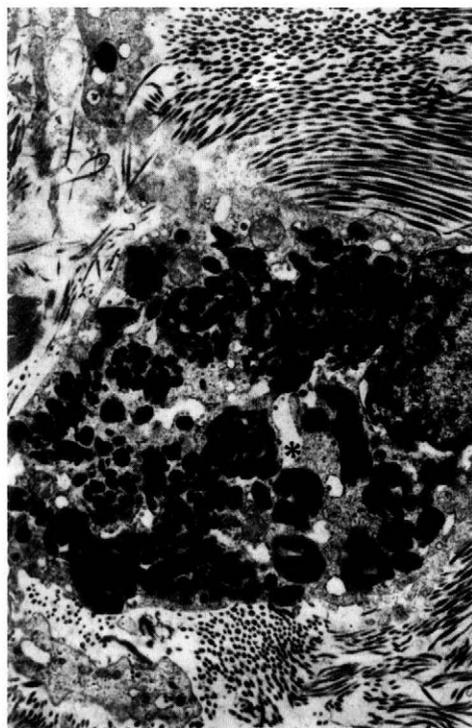
Condensation and margination of chromatin was the basic characterization of nuclear apoptotic changes



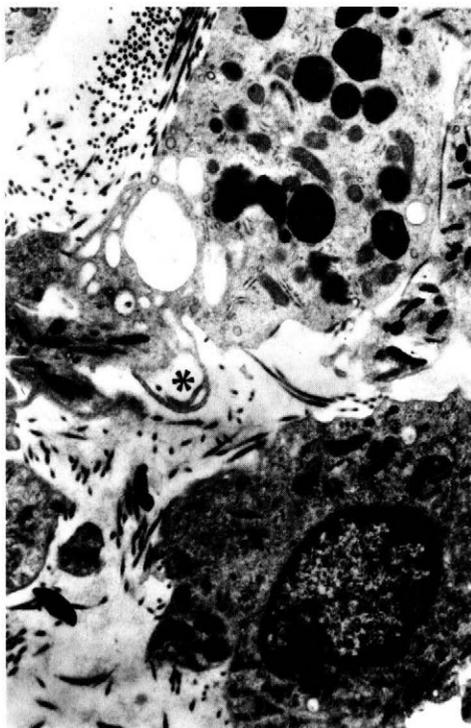
1. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. Macrophage with increased endoplasmic reticulum and ingested collagen microfibrils (*); enlarge 36 000x



2. Electron micrograph of a melanoma in the progressive stage. Melanocyte contains intact cytoplasmic organelles, enlarge 9 200x



3. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. Dilatation of granular endoplasmic reticulum in a melanocyte (*); enlarge 5 060x



4. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. There are phagosomes in the cytoplasm of a melanophage as well as vacuolation of its cytoplasm close to the cell surface (*); enlarge 8 400x

(Fig. 7). Vacuolation and dilatation of the nuclear envelope were also observed (Fig. 3).

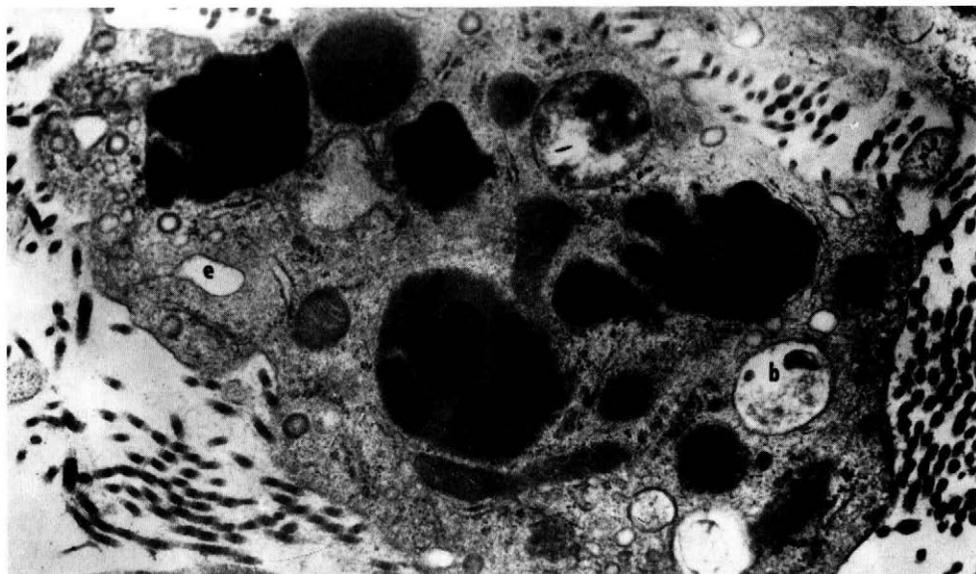
DISCUSSION

Cell death of tumour cells is observed predominantly in the regressive stage of pig melanoma (Gosset et al., 1996). Regression takes place in two phases. Significant increasing of lymphocyte numbers are rarely observed during both first and second phase of regression (Green et al., 1994). Immunohistochemically, CD3 positive lymphocytes were proved (Levkut et al., 1995). It means that most of lymphocytes detected electronmicroscopically are CD3 negative. Most of the natural killer cells (NK) are morphologically classified as large granular lymphocytes and are CD3 negative (Lydyard and Grossi, 1993). NK cells have a multifunctional repertoire of mechanisms for the stimulation of apoptosis in target cell (Levitz et al., 1995). The activity of NK cells in the peripheral blood of pigs is age related. Significant lytic activity of these cells does not develop until 5 weeks of age (Evans and Jaso-Friedman, 1993) and NK activity in peri-

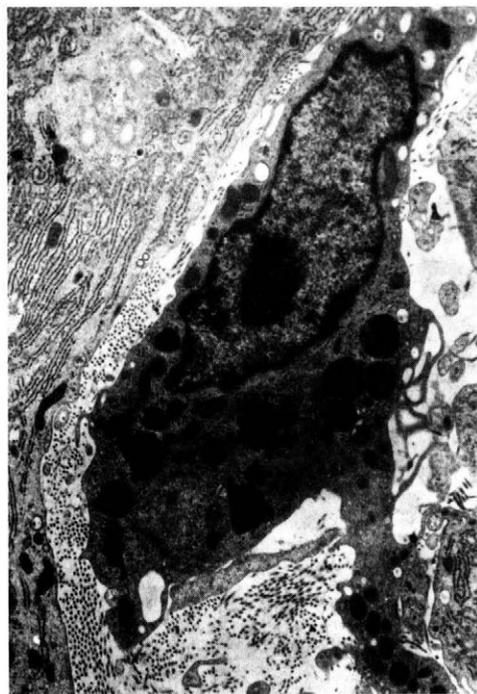
pheral blood is detected during tumour regression (Richardson and Misfeldt, 1989). The differentiation and/or maturation of NK cells seems to be related also to exposure to environmental pathogens (Evans and Jaso-Friedman, 1993).

According to Green et al. (1994) a rapid, massive infiltration of pigment-laden macrophages is characteristic for the first phase of regression. The macrophages contained more abundant endoplasmic reticulum, few phagosomes, and degraded collagen microfibrils. This favours both increased synthesis/secretion of proteins and phagocytic activity. The structure of such cells corresponds to that of epithelioid cells (Barnetson and Gawkrödger, 1993). However, these cells have preserved obvious phagocytic activity in comparison with epithelioid cells of granulomatous sensitivity. This suggests that these cells are derived from activated macrophages.

Morphological changes in melanoma cells during cell death indicate primary changes in the endoplasmic reticulum. Vacuoles observed in the cytoplasm of the tumour cells are probably of dual origin: (i) those arising from the dilatation of endoplasmic reticulum and (ii) those following the degradation of melanin pigment



5. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. One optically empty vacuole (e) and other with residual bodies (b) in the cytoplasm of a melanophage; enlarge 30 000x



6. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. There are apoptotic fragments in melanophage cytoplasm bound to its membrane; enlarge 6 500x

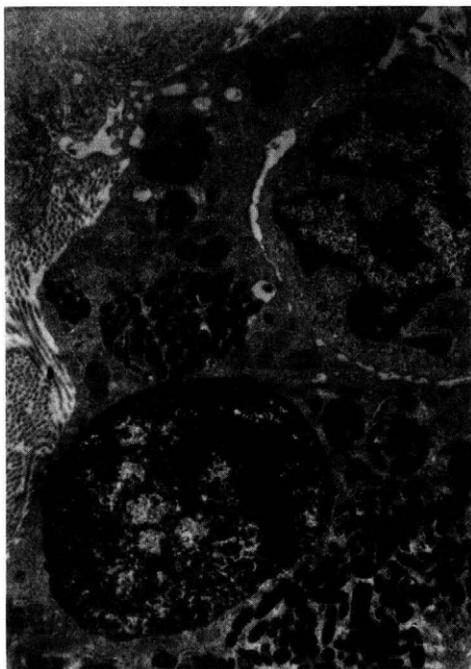
in phagosomes. These vacuoles move to the cell margin. Crater-like cavities arise probably after fusion of vacuoles with the cell surface. The eruption of vacuoles at the periphery of the cell is proposed to be one of the causes of shrinkage in the tumour cells. Similarly the production of melanin pigment and other protein substances is broken down with the loss of endoplasmic reticulum function.

The fact that cytokine-mediated apoptosis can occur without a nucleus indicates that no specific gene induction is required for this death process. The cells seem to have an intrinsic death programme in the cytoplasm, which may be activated by cytokine (Nagata and Goldstein, 1995).

Less frequently, nuclear changes have been observed as condensation and margination of chromatin without vacuolation in the cytoplasm. The nucleus undergoes condensation as endonucleases are activated and begin to degrade nuclear DNA (Thompson, 1995).

Ultrastructural features of dying tumour cells found in pig melanoma are characteristic of apoptosis. However, there are two different types of programmed cell death. Apoptotic changes in the nucleus of tumour cells without alteration of cytoplasmic structures indicate fast tumour cell damage. Consecutive alteration of some cell organelles, shrinkage of cells without apoptotic changes in the nucleus indicate the slow killing mechanism of tumour cells.

Although regression of pig melanoma is the complex event in which the immune system participates (Green et al., 1994) it is not clear what immunocom-



7. Electron micrograph of a melanoma in the regressive stage. There is a condensation and marginalization of nuclear chromatin in the melanocyte; enlarge 8 000x

petent cells in pig melanomas result in the fast and slow killing mechanisms of tumour cells, respectively. It should be taken into the account, that changes in the cytoplasm of tumour cells were connected with the binding of epithelioid cells to these cells. On the other hand, alteration of nuclear apparatus of the tumour cells was closely opposed to the NK cell. Duke et al. (1988) showed that apoptosis-associated DNA fragmentation was a target mediated phenomenon inducible by cytotoxic T lymphocytes and other killer cells. Similarly, little is known about how epithelioid cells are involved in apoptosis, although their progenitors, i. e. activated macrophages are the most important source of tumour necrosis factor.

REFERENCES

BARNETSON, R. – GAWKRODGER, D. (1993): Hypersensitivity – Type IV. In: ROIT, I. – BROSTOFF, J. – MALE, D.

(eds.): Immunology. 2nd ed. London, Mosby-Year Book Europe Ltd, pp. 22.1–22.12.

BURSCH, W. – OBERHAMMER, F. – SCHULTE-HERMANN, R. (1992): Cell death and its protective role against disease. *Trends Pharmacol. Sci.*, *13*, 245–251.

COHEN, J. J. (1993): Apoptosis. *Immunol. Today*, *14*, 126–130.

DIVE, C. C. – EVANS, A. – WHETTON, A. D. (1992): Induction of apoptosis – new targets for cancer chemotherapy. *Semin. Cancer Biol.*, *3*, 417–427.

DUKE, R. C. – SELLINS, K. S. – COHEN, J. J. (1988): Cytolytic lymphocyte-derived lytic granules do not induce DNA fragmentation in target cells. *J. Immunol.*, *141*, 2191–2194.

EVANS, D. L. – JASO-FRIEDMAN, L. (1993): Natural killer (NK) cells in domestic animals: phenotype, target cell specificity and cytokine regulation. *Vet. Res. Commun.*, *17*, 429–447.

GOSSETT, R. – KIER, A. B. – SCHROEDER, F. – MCCONILEY, D. – FADOIL, V. – AMOSS, M. S. (1996): Cycloheximide-induced apoptosis in melanoma cells derived from regressing cutaneous tumours of Sinclair swine. *J. Comp. Pathol.*, *115*, 353.

GREENE, J. F. – TOWNSEND, J. S. – AMOSS, M. S. (1994): Histopathology of regression in Sinclair swine melanoma. *Lab. Invest.*, *71*, 17.

LAM, K. M. – VASCONCELOS, A. C. – BICKFORD, A. A. (1995): Apoptosis as a cause of death in chicken embryos inoculated with Newcastle disease virus. *Microbi. Pathogenesis*, *19*, 169–174.

LEVITZ, S. M. – MATHEWS, H. L. – MURPHY, J. W. (1995): Direct antimicrobial activity of T cells. *Immunol. Today*, *16*, 387–391.

LEVKUT, M. – KOLODZIEYSKI, L. – LEDECKÝ, V. – DAXNEROVÁ, K. (1995): Familial melanoma in the progeny of a Duroc and Slovak White crossbred sow. *J. Comp. Pathol.*, *113*, 233–239.

LOWE, S. W. – RULEY, H. E. – JACKS, T. – HOUSMAN, D. E. (1993): p-53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. *Cell*, *74*, 957–967.

LYDYARD, P. – GROSSI, C. (1993): Cells involved in immune responses. In: ROIT, I. J. – BROSTOFF, J. – MALE, D. (eds.): Immunology. 2nd ed. London, Mosby-Year Book Europe Ltd, pp. 2.2 – 2.20.

NAGATA, S. – GOLDSTEIN, P. (1995): The fast death factor. *Science*, *267*, 1449–1456.

RICHERSON, J. T. – MISFELDT, M. L. (1989): Host environment as a modulating factor of swine natural killer cell activity. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, *23*, 309–319.

THOMPSON, C. B. (1995): Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, *267*, 1456–1462.

TRAUTH, B. C. – KLAS, C. – PETERS, A. M. J. – MATZKU, S. – MOLLER, P. – FALK, W. – DEBATIN, K. M. – KRAMMER, P. H. (1989): Monoclonal antibody-mediated tumour regression by induction of apoptosis. *Science*, *245*, 301–305.

UEDA, N. – SHAH, S. V. (1994): Apoptosis. *J. Lab. Clin. Med.*, *124*, 169–177.

Received: 97-07-15

Accepted after corrections: 97-11-28

Contact Address:

Doc. MVDr. Mikuláš Levkut, CSc., Univerzita veterinárskeho lekárstva, Komenského 73, 041 81 Košice, Slovenská republika
Tel. +421 95 622 99 24, e-mail: levkut@vsvnov.uvm.sk

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna (ÚZLK)

Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38

Máte zájem o pravidelné sledování nejčerstvějších informací ze zahraničních odborných časopisů?

Tento požadavek Vám rádi splníme, objednáte-li si naši informační reprografickou službu „Obsahy zahraničních časopisů a články“ typu „Current Contents“.

Vyberete-li si z každoročně aktualizovaného **Seznamu časopisů objednaných do fondu ÚZLK** sledování nejzajímavějších časopisů z Vašeho oboru, zašleme Vám nejprve kopie obsahů nejčerstvějších čísel časopisů a na základě výběru kopie požadovaných článků.

Chtěli bychom Vás také upozornit na další reprografickou službu ÚZLK, a to na poskytování kopií článků z knih a časopisů, které jsou ve fondu ÚZLK. Požadavky na tyto kopie můžete uplatňovat v průběhu celého roku na formulářích „Objednávka reprografické práce“, které si můžete objednat v Technickém ústředí knihoven, Solniční 12, 601 74 Brno, pod katalog. č. TÚK 138-0.

Veškeré další informace a objednávky na reprografické služby včetně Vašich připomínek Vám poskytneme na adrese:

Ústřední zemědělská a lesnická knihovna – ÚZPI

Odd. reproslužeb

Slezská 7, 120 56 Praha 2

Poštovní schránka 39

Telefonické dotazy: 02/24 25 79 39, linka 329, 421 nebo 306

EXCEPTIONAL OCCURRENCE AND EXTENT OF MALIGNANT MELANOMA IN PIG

VÝJIMEČNÝ VÝSKYT A ROZSAH MALIGNÍHO MELANOMU U PRASETE

K. Fortýn¹, V. Hruban², V. Horák¹, J. Tichý³

¹ *Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic, Liběchov, Czech Republic*

² *Czech University of Agriculture, Praha, Czech Republic*

³ *Patho-anatomic Department, Hospital, Turnov, Czech Republic*

ABSTRACT: The hereditary malignant melanoma (melanoblastoma) was recognised in a herd of miniature laboratory pigs kept at the Institute of Animal Physiology and Genetics, Academy of Sciences of the Czech Republic. These pigs genetically came from the original Hormel strain imported from the USA in 1967. Due to blood group studies, they were crossed with several other breeds and strains (Göttingen miniature pig strain, Canadian Landrace, Cornwall, Vietnamese pigs) during the past time. Selective breeding of animals bearing exophytic form of melanoma suggested a genetic basis to this disease. Mating of half-siblings, which have been healed of tumours by surgical ischaemization (devitalization), proved a simple genetic predisposition. The segregation of tuberodular form of melanoma in these families showed a simple mendelian character (1 : 1). The fast growth phase after birth, strong aggressivity and severity of the tumour in some animals could be explained by matings of related parents and generally by inbreeding in our miniature pig line ($F = 0.30$). In one case, we observed an exceptionally large tumour and broad dissemination of the primary skin tumours. Metastatic lesions were greater in size and extent in comparison with cases published previously. The case report of this tumour is documented morphologically and histologically. The piglet with this tumour was strongly wasted and died at the 81st day after birth due to massive embolization of the *arteria pulmonalis* (sudden respiratory distress and dyspnoea). The two largest primary tuberodular exophytic tumours (9 x 6 cm and 2.5 x 2.5 cm) were prominently elevated on the skin. Metastases were broadly disseminated in various organs and tissues: lungs, liver, gall-bladder, spleen, kidneys, adrenals, urinary-bladder, uterus, ovaries, pancreas, thymus, lymph nodes, thyroid gland and all segments of digestive tract including rectum. Great size and unusual locations of metastases were observed in organs where their occurrence in people or animal models is very rare or still has not been described (heart, diaphragm, aorta). Light microscopy confirmed the direct macroscopic examination and suggested that the histopathological features of the tumour are similar to human melanoma.

malignant melanoma; metastases; miniature pig

ABSTRAKT: V linii miniaturních laboratorních prasat, u kterých se vyskytuje hereditární maligní melanom (melanoblastom), se narodilo se se neobvyklou multiplicitou primárního kožního tumoru a s extrémním rozsahem metastáz, který nebyl dosud v literatuře zaznamenán. Kazuistika zvířete, jehož příčinou úhynu byla masivní embolizace *arteria pulmonalis* a mnohočetná ložiska bronchopneumonie, je morfologicky a histologicky doložena. Metastázy byly pozorovány v tkáních a orgánech (např. v aortě), kde se u člověka nebo živočišných modelů nevyskytují vůbec nebo jsou v masivním rozsahu vzácné (např. srdce a bránice).

maligní melanom; metastázy; miniaturní prasce; kazuistika

ÚVOD

Kongenitální pigmentové tumory u prasat (maligní melanomy, syn. melanoblastomy) byly popsány před šedesáti lety u prasat plemene Duroc a Hampshire (Nordby, 1933). Hereditární forma tohoto nádoru je již přes dvacet roků sledována u kmene miniaturních laboratorních prasat Sinclair, která jsou příjmy descendenty staršího kmene Hormel (Hook aj., 1982;

Oxenhandler aj. 1979; Millikan aj. 1974; Tissot aj., 1987). Kromě benigních névů jsou u těchto prasat morfologicky rozlišovány dvě maligní formy. První je tzv. „lentigo maligna melanoma“. Je podobná lidskému plošně se šířícímu tumoru. Druhý má nodosní formu s „exofytickým růstem“. Millikan aj. (1974) a Oxenhandler aj. (1979) se pokusili o srovnání prasečího maligního melanomu s lidskou formou nádoru podle klasifikace Clark I–V. Jako nejmaligntější je

považována tuberonodulární (exofytická) forma (odpovídající klasifikaci Clark IV–V), u které dochází k prorůstání do hloubky (vertikalizaci) a šíření metastáz. Oxenhandler aj. (1979) v 60 pitvách uhynulých prasat zjistili u 25 % výskyt orgánových metastáz. Metastázy byly pozorovány nejčastěji v lymfatických uzlinách (55 %), na plicích (28 %), slezině (20 %), játrech (18%) a brzlíku (12 %). Zřídka byly zjištěny na žaludku, tenkém střevě, ledvinách a dalších orgánech.

Prasečí maligní melanom má z hlediska histologického mnoho shodných rysů s lidskou formou tumoru a díky hereditární predispozici představuje velmi cenný model (Hook aj., 1982; Misfeldt a Grimm, 1994). U obou nádorů však existují určité odlišnosti. Prasečí melanoblastom se často tvoří již *in utero*, jeho výskyt není závislý na UV záření a s vysokou frekvencí podléhá spontánní regresi. Regrese vede zpravidla k částečné (*vittiligo*) nebo i totální depigmentaci. Spontánní vymizení se pohybuje od 50 % (Oxenhandler aj., 1982) až do 100 % (Greene aj., 1994). Podle posledně citovaných autorů se tak jedná o benigní charakter nádoru. Tato představa je však v rozporu s nálezy, které jsme zaznamenali v naší linii miniaturních prasat selektovaných na výskyt melanoblastomu, kde více jak polovina postižených a neléčených zvířat uhyně během čtyř až šesti měsíců po narození. Malignitu prasečího melanoblastomu v této práci dokumentujeme kazuistikou zvířete, u něhož po nekropsii byl zaznamenán neobvyklý rozsah nádoru.

MATERIÁL A METODY

U rezavé miniaturní prasničky (číslo B 166) z linie MLM (Melanoblastoma-bearing Liběchov Minipigs), která uhynula ve věku 81 dnů, byl zjištěn případ rozsáhlého melanoblastomu. Prasnička pocházela z vrhu šesti selat, z nichž u tří se vyskytovaly melanomy exofytického charakteru na končetinách. Tento vrh vznikl z páření prasnice nesoucí melanoblastom, která byla vyléčena devitalizační (ischemizační) technikou (Fortýn aj., 1995) a kance, který sice nádor neměl, ale přenáší genetickou dispozici pro toto onemocnění. Původ MLM linie miniaturních prasat s hereditárním melanoblastomem je složitý. Na vzniku stáda miniaturních prasat chovaného v Ústavu živočišné fyziologie a genetiky AV ČR v Liběchově se podílelo pět plemene a kmenů. Především to byli jedinci kmene Hormel (60,1 %), kteří byli importováni v roce 1967, a dále plemena Cornwall (1,6 %), Landrace (2,5 %), vietnamské prase (25,4 %) a miniaturní prase kmene Göttingen (10,4 %). Z tohoto stáda byla selekcí na výskyt melanoblastomu vytvořena linie MLM, která je početně velmi omezená (asi 20 jedinců) a vykazuje vysoký stupeň inbredizace (koeficient inbreedingu podle Wrighta $F = 0,29$ až $0,32$). Základní morfologická a histologická charakteristika melanoblastomu u této linie miniprasat byla již publikována dříve (Fortýn aj., 1994).

Od prasničky B 166 byly po nekropsii odebrány vzorky z primárních tumorů a z metastáz pro histologické vyšetření. Po jejich zmrazení v tekutém dusíku z nich by-

ly na přístroji Tissue-Tek II Cryostat (Miles, USA) připraveny 10 μ m silné řezy, které byly fixovány v 96% etylalkoholu (15 min), barveny Weigertovým hematoxylinem (10 min) a dobarveny eosinem (1 min).

VÝSLEDKY

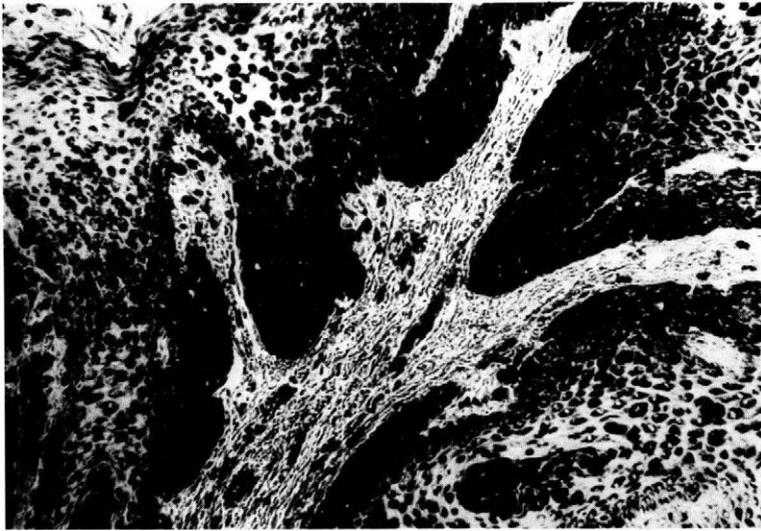
Kazuistika – morfologický popis

U prasničky B 166 byly ihned po narození pozorovány primární kožní tumory. Na hřbetě byl rozsáhlý melanoblastom velikosti 9 x 6 x 4 cm, 5 cm kaudálně na bedrech bylo další ložisko o průměru 2,5 cm. První z tumorů byl elevovaný a silně černě pigmentovaný. Na povrchu byl oploštělý a hrubě rozbrázděný, z fisurálních štěrbin prosakovala serózně hemoragická tekutina místy až černě zbarvená. Tumor byl zřetelně ohraničený a proti spodině celkem dobře pohyblivý. Sele špatně přijímalo krmivo a v dekrepidním stavu po 81 dnech uhynulo na náhlou respirační příhodu provázenou dyspnoickými záchvaty.

Při sekci se ukázalo, že tumor je kompaktní tuberonodosní a plošně prorůstá do hloubky až k interkostálním prostorům, kde bylo naředělé zbarvení (okrajová melanoza). Pod uhlavě černým tumorem byl interkostální prostor nápadně vyklenutý a palpačně zde bylo možno předpokládat tužší endothorakálně uloženou rezistenci. Při pitvě krku a hrudníku se objevily značné zduřelé lymfatické uzliny uložené i okolo trachey, kterou zčásti komprimovaly.

V úrovni horní thorakální apertury uzliny splývaly s mediastinálními lymfony v paketovité útvary až 10 cm velké. Retrosternálně tvořily uzliny řetěz uložený podél sternu. Paraventrálně zadní mediastinální uzliny tvořily hrubý konvolut, který se plošně rozrůstal po celé ploše bránice na obou plochách. Bránice měla tloušťku dva až tři cm se značně sníženou elasticitou. Obě plíce byly málo vzdušné, poseté záplavou metastáz velikosti 1,0 až 1,5 cm (melanoblastomový „tygroid“). Metastázy v plicích byly uloženy ve všech vrstvách plicního parenchymu. Na několika místech, hlavně bazálně, byla nalezena ojedinělá bronchopneumonická ložiska. Na perikardu i epikardu bylo bohatě rozsev melanoblastomových metastáz velikosti asi 3 až 4 mm. Na řezu v myokardu síni i komor byly dobře viditelné drobné metastázy. V pravé srdeční komoře byl masivní embolus, který vyplňoval kmen i obě hlavní větve pulmonální arterie. Nález ukazoval na masivní embolii *arteria pulmonalis*, která byla bezprostřední příčinou letálního konce. Na *arcus aortae* v blízkosti odstupu hlavních arteriálních větví bylo jedno metastatické ložisko asi 0,5 cm velké a několik drobnějších v okolí.

Mediastinální tumorózní ložisko subfrenicky prorůstalo podél *pars affixa hepatis* i do jaterního parenchymu na značnou vzdálenost ventrálním směrem. Podél *vena cava caudalis* se tumor rozprostíral v retroperitoneu. Podél *ligamentum hepatoduodenale* se tumor rozrůstal k duodenu a zaujímal *ductus choledochus* a oba *ductii hepatici*, které si i přes tento nález zachovaly



1. Primární melanoblastom na kůži s masivní invazí do koría (barvení haematoxylin-eosin, 230x) – Primary melanoblastoma on skin with invasion to corium (haematoxylin-eosin staining, 230x)

průchodnost. Žlučník byl silně prostoupen hustým nahromaděním melanoblastomových metastáz. Pankreas byl lehce zvětšený, nápadně tuhé konzistence. Na povrchu i ve všech vrstvách pankreatu byly na řezu prokázány disperzně uložené metastázy. Slezina byla lehce zvětšená se záplavou nádorových metastáz. V hilu sleziny byly nalezeny dvě uzliny s metastázami o průměru asi 3 cm. Obě ledviny byly hustě poseté metastázami, které byly uloženy disperzně i v renálním parenchymu. Močový měchýř byl lehce distendovaný a na ventrální ploše pokryt splývajícími metastázami šifřícími se až k *chorda urachi*. Uterus a obě *tubae uterinae* byly obklopeny disperzními drobnými metastatickými ložisky, stejně tak jako obě ovaria. *Lymphonodi iliaci externi, interni i paraaortici* byly zduřelé s hojnými tumorozními metastázami.

Na žaludku, duodenu, jejunu a ileu bylo pozorováno velké množství disperzně lokalizovaných metastáz o velikosti 0,5 až 1 cm, které byly uloženy ve všech vrstvách zmíněných částí gastrointestinálního traktu. Mezi jednotlivými záhyby na tračniku byl bohatý povlak metastáz vyplňující hlavně prohlubně mezi jednotlivými odstavci. Jedna větší solitární metastáza byla uložena na ventrálním obvodu rekta. *Lymphonodi mesenterici i mesocolici* byly také hustě prostoupeny četnými metastázami.

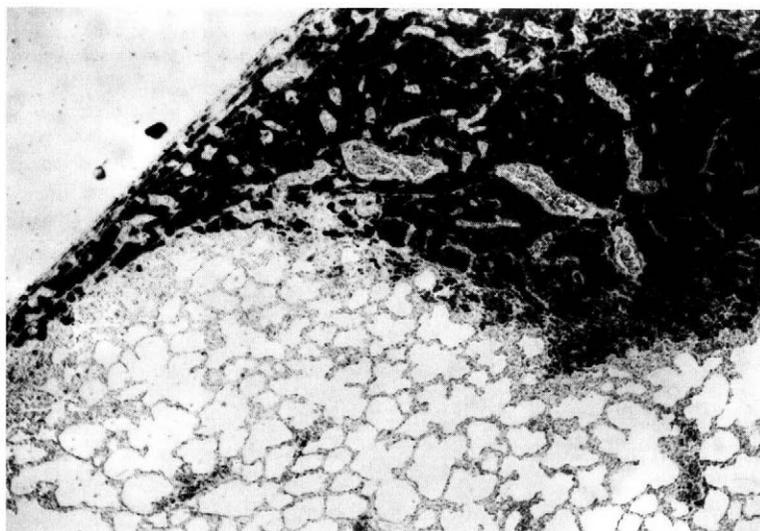
Histologické nálezy

Primární melanoblastomy na hřbetu vykazovaly tuberonodulární formu nádoru hluboko prorůstající až k *fascia dorsii*. Korium bylo značně zredukováno bohatou trabekulární i difúzní nádorovou infiltračí (obr. 1). Na periferii po okrajích tumoru se oddělovaly pruhovité (trabekulární) odnože ze základního nádorového lo-

žiska. Na mnoha místech byla prokázána invaze melanomu do lumina cév. V korii (*stratum reticulare a tela subcutanea*) byly nalezeny na mnoha místech četné shluky melanoblastů místy až v alveolárních formacích. V podkoží byly melanoblasty rozloženy disperzně (ve shlucích nebo jednotlivě) mezi fibrolipomatózními úseky vaziva.

Plice byla prostoupena hustě uloženými nádorovými metastázami, které měly solidní charakter a melanoblastom difúzně pronikal plicním parenchymem. Četnější nahromadění melanoblastů bylo peribronchiálně hlavně v místech ramifikace. Metastázy byly pozorovány i v plicních a hilových lymfónech. Na periferii byla hustá infiltrace melanoblasty subpleurálně a v intersegmentálních septech (obr. 2). Na srdci byly zjištěny suprikardiálně aglomerace melanoblastů v pruzích oddělených i splývajících. V myokardu byla disperzně uložena metastatická ložiska mezi svalovými vlákny. Podél aorty nalezená metastatická ložiska zasahovala do všech vrstev cévní stěny. V *adventicii* tvořila místy bohatou aglomeraci melanoblastů uložených v řídkém vazivu. Pod aortální *intimou* vytvářely nahromaděné melanoblasty místy shluky a pronikaly přes *intimu* až do cévního lumina.

V játrech tvořily melanoblasty početná kompaktní ložiska s difúzní tkáňovou infiltračí. Subkapsulárně byly nalezeny pruhovité infiltráty z melanoblastů, které se propagovaly perilobulárně i v portobiliárních prostorech Kiernanových. Poměrně řídké byly zastíjeny melanoblasty solitárně mezi jaterními trámcí. Ledviny v subkapsulární zóně měly četná kompaktnější, difúzně uspořádaná ložiska melanoblastů s propagačí řídkým peritubulárním pojevem do nitra renálního parenchymu. V centrálních partiích renální tkáň byla menší disperzně lokalizovaná ložiska tvořená shluky melanoblastů, které místy přecházely v pruhovité peritubulární infiltráty dřeňové i kortikální vrstvy. Pankreas vykazoval



2. Plicní metastáza se subpleurální lokalizací (barvení hematoxylin-eosin, 250x) – Lung metastasis of melanoblastoma at subpleural sites (haematoxylin-eosin staining, 250x)

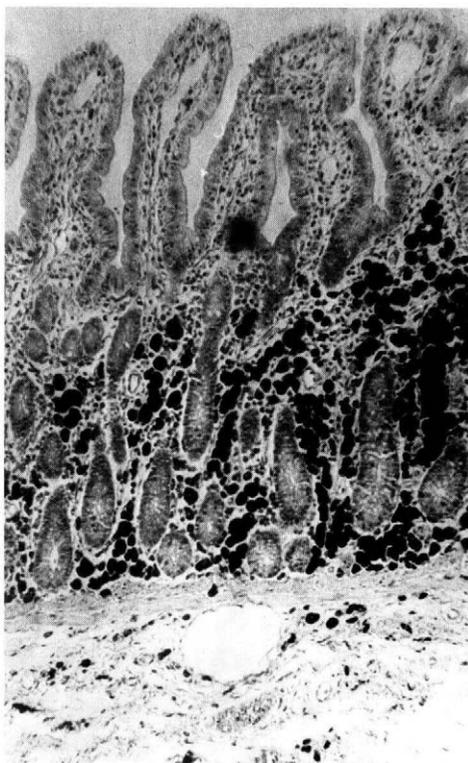
obdobné rozptýlení melanoblastů v povrchových i hlubokých vrstvách parenchymu většinou s difúzní až disperzní lokalizací.

Na gastrointestinálním traktu byla v celém jeho rozsahu nalezena metastatická ložiska převážně subserózně s difúzním nebo disperzním uspořádáním melanoblastů. Menší shluky melanoblastů byly uloženy v slizničném a podslizničném stromatu (obr. 3). Ojedinele byly pozorovány disperzně rozmístěné melanoblasty v *muscularis externa* na tenkém i tlustém střevě. Na žaludku v *muscularis externa* byl podobný obraz metastáz. Výraznější aglomerace melanoblastů byly v místech, kde na sebe naléhaly jednotlivé oddíly tračníku. Zde v subserózním uložení tvořily melanoblasty i několikavrstevnaté plošné povlaky se známkami infiltrace přilehlých částí subserózního pojiva místy zasahující do *muscularis externa*.

Mizní uzliny z různých lokalizací byly vyplněny ve všech vrstvách hustým infiltrátem melanoblastů, což vedlo až k úplnému zastření vlastní struktury uzlin. Na ostatních orgánech (*glandula thyroidea*, thymus, nadledviny) byly nalezeny disperzně i difúzně lokalizované metastázy.

DISKUSE

Prasečí model maligního melanomu je postaven zejména na využívání miniaturních prasat kmene Sinclair, která jsou chována především na Univerzitě v Missouri (Columbia) a na odvozené linii značené SMS-TAMU, držené na Univerzitě v Texasu (Texas A M University) – (Misfeldt a Grimm (1994), Tissot aj. (1987). Mnichovské miniaturní prase (Münchener Miniaturschwein Troll), u něhož se vyskytuje také hereditární forma melanomu, nedoznalo žádného rozšíření a jako experimentální model je zatím neznámé (Miller aj., 1995). Pokud jde o prasata Sinclair, je u nich popisována velmi častá (Oxenhandler aj., 1982; Misfeldt a Grimm,



3. Metastáza melanoblastomu do jejunu s bohatou nádorovou infiltrací mukozy (barvení hematoxylin-eosin, 230x) – Metastasis of primary melanoblastoma into the jejunum with rich tumour infiltration of mucosa (haematoxylin-eosin staining, 230x)

1994) nebo dokonce 100% spontánní regrese melanoblastomu (Greene aj., 1994). Tím byla navozena představa, že prasečí melanoblastom představuje biologicky zcela jinou chorobu než lidský melanoblastom, přestože oba mají shodnou morfologii. Domníváme se, že vinu na tomto názoru nese nepřesná interpretace nekrotických povrchových změn pozorovaných citovanými autory u některých nádorových ložisek. Bylo zcela opomenuto, že každý maligní tumor má v centrálních partiích obvykle hůře živěné zóny nádorové tkáně a že částečné regresivní změny ještě nemění nic na zhoubné povaze prasečího melanoblastomu. Povrchová hyperkeratóza s našedlou barvou zakrývá v hloubce a často i po stranách bující nádorovou tkáň schopnou nejen růstové, ale i metastatické aktivity. V naší linii MLM miniaturních prasat se spontánní regrese vyskytovala jen výjimečně. Ze 76 postižených zvířat byla pozorována jen u tří jedinců dlouhodobě přežívajících. O malignitě nádoru u této linie svědčí mj. případ popsáný v této práci i skutečnost, že zhruba 70 % prasat s melanoblastomy, u kterých nebyl proveden devitalizační (devaskularizační) zákrok na primárním kožním nádoru (Fortýn aj., 1995), uhynulo.

Rozdíl ve výskytu spontánní regrese a v agresivitě melanoblastomu u miniprasat linie MLM a u kmene Sinclair mohou být dány geneticky. V naší linii miniprasat probíhá díky nízkému počtu jedinců inbreeding ($F = 0,29$ až $0,32$). V posledních generacích bylo používáno páření polosourozenců, kteří melanoblastom měli, ale byli vyléčeni devitalizační (devaskularizační, ischemizační) technikou (Fortýn aj., 1995). V těchto pářeních, kde se melanoblastom dědí jednoduše mendelisticky 1 : 1 (připraveno pro publikaci), je zaznamenán časnější výskyt primárních kožních nádorů (již při narození nebo krátce po něm), které vykazují zvýšenou agresivitu (převaha mnohočetných tuberodulárních forem, generalizovaný výskyt metastáz a vyšší mortalita).

LITERATURA

- BLANGERO, J. – TISSOT, R. G. – BEATTIE, C. W. – AMOSS, M. S. (1996): Genetic determinants of cutaneous malignant melanoma in Sinclair swine. *Brit. J. Canc.*, **73**, 667–671.
- FORTÝN, K. – HRUBAN, V. – HORÁK, V. – TICHÝ, J. (1995): Experimentální léčba zhoubného melanomu pomocí ischemizace (devitalizace). *Klin. Onkol.*, **8**, 11–15.
- FORTÝN, K. – HRUBAN, V. – HORÁK, V. – HRADECKÝ, J. – TICHÝ, J. (1994): Melanoblastomová nemoc u laboratorních miniprasat: model pro studium lidských maligních melanomů. *Vet. Med. – Czech*, **39**, 597–604.
- GREENE, J. F. – TOWNSEND, J. S. – AMOSS, M. S. (1994): Histopathology of regression in Sinclair swine model of melanoma. *Lab. Invest.*, **71**, 17–24.
- HOOK, R. R. – BERKELHAMMER, J. – OXENHANDLER, R. W. (1982): Animal model of human disease. Melanoma. *Am. J. Pathol.*, **108**, 130–133.
- MILLIKAN, L. E. – BOYLON, J. L. – HOOK, R. R. – MANNING, P. J. (1974): Melanoma in Sinclair swine: a new animal model. *J. Invest. Dermatol.*, **62**, 20–30.
- MISFELDT, M. L. – GRIMM, D. R. (1994): Sinclair miniature swine: an animal model of human melanoma. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, **43**, 167–175.
- MÜLLER, S. – WANKE, R. – DISTL, O. (1995): Segregation von Pigmentzellanomalien beim Münchener Miniaturschwein (MMS) Troll in Kreuzungen mit der Deutschen Landrasse. *Dtsch. Tierärztl. Wschr.*, **102**, 391–394.
- NORDBY, J. E. (1933): Congenital melanotic skin tumors in swine. *J. Hered.*, **24**, 361–364.
- OXENHANDLER, R. W. – ADELSTEIN, E. H. – HAIGH, J. P. – HOOK, R. R. – CLARK, W. H. (1979): Malignant melanoma in the Sinclair miniature swine. *Am. J. Pathol.*, **96**, 707–714.
- OXENHANDLER, R. W. – BERKELHAMMER, J. – SMITH, G. D. – HOOK, R. R. (1982): Growth and regression of cutaneous melanomas in Sinclair miniatureswine. *Am. J. Pathol.*, **109**, 259–269.
- TISSOT, R. G. – BEATTIE, C. W. – AMOSS, M. S. (1987): Inheritance of Sinclair swine cutaneous malignant melanoma. *Canc. Res.*, **47**, 5542–5545.

Received: 97-09-22

Accepted: 97-11-24

Kontaktní adresa:

RNDr. Vratislav Horák, CSc., Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, 277 21 Liběchov, Česká republika
Tel. +420 206 69 70 24, fax +420 206 69 71 86, e-mail: horak@site.cas.cz

ANIMAL PRODUCTION AND HEALTH NEWSLETTER**No. 27, Dec. 1997**

In his Editorial address to the reader Martyn Jeggo, Head of the Animal Production and Health Section, evaluates the results of the last year. In reproduction and nutrition the section focused on using RIA measurement of progesterone to identify alternative feed resources and to start measuring the impact of using these on animal productivity. Progesterone measurement was used to identify problems with the delivery of artificial insemination services. In animal health, ELISA technology was used to continue monitoring national disease control/eradication programmes such as the FAO Global Rinderpest Eradication Programme, control of brucellosis, trypanosomosis, foot-and-mouth disease, contagious bovine pleuropneumonia and bovine leucosis. The validation of an assay to measure purine derivatives in urine as an approach to determining the contribution of rumen microorganisms to the protein needs of livestock. Transfer and use of PCR within the context of

disease control/eradication programmes in developing countries has been commenced.

Support for the use of ELISA and RIA, use of purine derivatives measurement and PCR to deal with particular areas will be followed also in 1998. The programme on veterinary drug residue monitoring to help countries to improve food quality and environmental protection will be a new activity.

The Forthcoming Events, Past Events, Status of Existing Co-Ordinated Research Projects, New Co-Ordinated Research Projects, Computer Software Programs, Geographical Information Systems Update, and Publications printed, in press and in preparation are the sections of Animal Production and Health Newsletter No. 27, issued by Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture and FAO/IAEA Agriculture and Biotechnology Laboratory.

Karel Hruška

REVUE SCIENTIFIQUE ET TECHNIQUE

An international journal published by OIE in a new format (three issues in April, August and December per volume) is indexed in a number of important databases and abstract journal. Instructions to Authors you can find on <http://www.oie.int>. The impact factor is 0.253.

Topics in 1997 to 1999 are as follows:

- Contamination of animal products: prevention and risk for animal health – Vol. 16 (1)
- Contamination of animal products: prevention and risk for public health – Vol. 16 (2)

- Genetic resistance to animal diseases – Vol. 17 (1)
- Veterinary laboratories for infectious diseases – Vol. 17 (2)
- Management of animal health emergencies – Vol. 18 (1)

Each December issue presents papers submitted spontaneously by authors, and covers topics of great diversity, ranging from fields trials to specific research.

Karel Hruška

OCCURRENCE OF PHTHALIC ACID ESTERS (PAEs)
IN COMBINED FEEDSTUFFS AND ADIPOSE TISSUES
OF SWINE AND CATTLE^{*}VÝSKYT ESTERŮ KYSELINY FTALOVÉ (PAE) V KRMNÝCH SMĚSÍCH
A TUKOVÉ TKÁNI PRASAT A SKOTUJ. Raszyk¹, V. Gajdůšková¹, A. Jarošová¹, J. Salava², J. Palác²¹*Veterinary Research Institute, Brno, Czech Republic*²*District Veterinary Administration, Hodonín, Czech Republic*

ABSTRACT: Pilot studies of concentrations of phthalic acid esters in combined feedstuffs ($n = 21$) and porcine ($n = 6$) and bovine ($n = 6$) adipose tissues were conducted in the district of Hodonín in 1997. The samples were collected repeatedly in two feed processing plants and three swine and two cattle farms. Mean concentrations (mg/kg of original sample) of di-n-butyl phthalate (DBP), di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and sum of DBP + DEHP in combined feedstuffs were 0.207, 0.216 and 0.423, respectively. The corresponding values for porcine adipose tissue (subcutaneous back fat) were 3.363, 0.505 and 3.868, respectively, and for bovine adipose tissue (fat capsule of right kidney) 2.537, 0.790 and 3.327, respectively. The concentration of the sum of DBP + DEHP in feedstuffs permissible in the Czech Republic, (4.0 mg/kg of original sample) was exceeded in three of six pigs (4.260, 4.520, 6.920) and one of six cows (4.750). The widespread environmental contamination by PAEs, their adverse effects on live organisms and our findings of impermissible concentrations in adipose tissues of food animals rank them among topical hazardous contaminants also in the Czech Republic.

phthalic acid esters; di-n-butyl phthalate; di-2-ethylhexyl phthalate; feedstuffs; animal fat; swine; cattle; health risks; legislation

ABSTRAKT: V průběhu roku 1997 byla v okrese Hodonín uskutečněna pilotní studie zaměřená na sledování obsahu esterů kyseliny ftalové (PAE) v krmných směsích ($n = 21$) a v tukové tkáni prasat ($n = 6$) a krav ($n = 6$). Vzorky byly průběžně odebírány ve dvou výrobních krmných směsích, třech farmách prasat a dvou farmách skotu. V krmných směsích byly zjištěny následující průměrné hladiny ftalátů (mg/kg původní hmoty): dibutylftalát (DBP) 0,207; di-(2-ethylhexyl)ftalát (DEHP) 0,216 a suma DBP a DEHP 0,423. V tukové tkáni výkrmových prasat (podkožní tuk z hřbetní části těla) byly zjištěny následující průměrné hladiny ftalátů (mg/kg původní hmoty): DBP 3,363; DEHP 0,505 a suma DBP a DEHP 3,868. Platné hygienické limity pro potraviny v České republice jsou pro PAE definovány jako suma DBP a DEHP v mg/kg původní hmoty. V tukové tkáni tří prasat, ze šesti vyšetřených, byla překročena nejvyšší přípustná hodnota PAE, která činí 4 mg/kg původní hmoty (4,260, 4,520, 6,920). V tukové tkáni krav (tukové pouzdro pravé ledviny) byly zjištěny následující průměrné hladiny ftalátů (mg/kg původní hmoty): DBP 2,537; DEHP 0,790 a suma DBP a DEHP 3,327. V tukové tkáni jedné krávy, ze šesti vyšetřených, byla překročena nejvyšší přípustná hodnota PAE (4,750 mg/kg původní hmoty). Plošná kontaminace prostředí PAE, jejich prokázané negativní účinky na živé organismy a naše výsledky o hladinách PAE v krmivech a následně v tukových tkáních hospodářských zvířat v nadlimitních koncentracích řadí estery kyseliny ftalové mezi aktuální rizikové kontaminanty i v České republice.

estery kyseliny ftalové; dibutylftalát; di-(2-ethylhexyl)ftalát; krmné směsi; živočišný tuk; prasata; skot; farmy; výrobní krmných směsí; zdravotní riziko; legislativa

^{*} Supported by the Ministry of Agriculture of the Czech Republic (Projects RE 5562 and RE 5564) and the Grant Agency of the Czech Republic (Grant No. 525/96/0924)

INTRODUCTION

Phthalic acid esters (PAEs) are widely used in the chemical industry as plasticizers, additives to paints, inks, lacquers, glues, cosmetics, films, repellents, pesticides, etc., and have become an ubiquitous component of the environment in all industrial countries (Ševela and Gajdůšková, 1996).

PAE are derivatives of phthalic acid with the summary formula $C_6H_4(COOH)_2$. The w/w concentration of PAE in PVC reaches up to 40%. Since PAEs are not bound chemically to plastics, they can migrate and be eluted into hydrous, adipose and other milieus.

Most of the phthalates are lipid-soluble and can be absorbed by skin, mucous membranes and lung epithelium. They cumulate mostly in the liver and adipose tissues. A significant metabolite of di-2-ethylhexyl phthalate is the toxic mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP). Most of the metabolites are excreted in urine (Thomas and Northup, 1982).

While the acute toxicity of PAEs is low, spermiotoxic, hepatotoxic, nephrotoxic, embryotoxic, teratogenic and cancerogenic effects were demonstrated after long-term exposures (Ševela and Gajdůšková, 1996).

Data on the contents of PAEs in food packaging materials (Gajdůšková et al., 1996), the human food chain (Sharman et al., 1994) and peritoneal fluid of patients treated by peritoneal dialysis (Ševela et al., 1996) have been published recently. Permissible concentrations of PAEs have been set only for comestibles (HEM-3524-10. 10. 1996).

The objective of this pilot study was to obtain basic data on the presence of PAEs in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle.

MATERIAL AND METHODS

The contents of the two most frequently used PAEs di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) – in combined feedstuffs (CF) and adipose tissues of swine and cattle were investigated.

CF samples were collected at three swine farms, two cattle farms and in two feed processing plants. Altogether 13 samples of CF for swine, 4 samples of CF for cattle and 4 samples of CF for poultry were analysed.

Dorsal fat samples were collected upon slaughter from six finishing pigs aged 240–250 days with a liveweight of 110–120 kg coming from 3 farms.

Kidney fat samples were collected upon slaughter from six dairy cows aged 3–4 years with a liveweight of 400–500 kg coming from two farms.

The collection of the adipose tissue samples was independent from the collection of feed sampling.

Only CF manufactured in any of the two feed processing plants were sampled at the farms.

PAEs were extracted from all the samples with organic solvents, co-extracts were removed by gel permeation chromatography (Bio-beads SX3) and the extracts of feedstuffs were cleaned with concentrated sulphuric acid and PAEs were determined by high performance liquid chromatography with UV detection. Detailed description of the analytical method will be published elsewhere (Jarošová et al., in press).

The results were processed using the Stat Plus Version 1.01 software (Matoušková et al., 1992) and a table containing the number of tested samples and mean, SD and range values was prepared. The findings of PAEs in animal fat samples were confronted with the order of the Chief Hygienist of the Czech Republic (HEM-3524 – 10th Oct. 1996).

RESULTS AND DISCUSSION

The concentrations of PAEs in the samples of combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle are presented in Tab. I.

The permissible concentration of PAEs in fat was exceeded in three pigs (4.260, 4.520, 6.920 mg/kg of original sample) and one cow (4.750 mg/kg of original sample).

The adipose tissue was chosen as the indicator of contamination of food animals, because PAEs are lipophilic and cumulate therein.

While the concentrations of DBP and DEHP in feedstuffs were approximately equal, the DBP : DEHP ratios in the porcine and bovine adipose tissues were 7 : 1 and 3 : 1, respectively. Compared with the bovine fat, the concentration of the sum DBP + DEHP in the porcine fat was higher by 16%.

No permissible concentration of phthalates in feedstuffs for food animals have been laid down in the

I. Contents of di-n-butyl phthalate (DBP) and di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle in the district of Hodonín in 1997

Material	n	DBP*	DEHP*	Sum of DBP + DEHP*
Combined feeds	21	0.207 ± 0.164 (0.07–0.83)	0.216 ± 0.086 (0.10–0.46)	0.423 ± 0.201 (0.20–1.12)
Porcine fat	6	3.363 ± 1.759 (1.37–6.12)	0.505 ± 0.206 (0.20–0.80)	3.868 ± 0.844 (1.79–6.92)
Bovine fat	6	2.537 ± 0.886 (1.76–4.17)	0.790 ± 0.379 (0.55–1.52)	3.327 ± 0.844 (2.61–4.75)

* all values are given in mg per 1 kg of original sample

Czech Republic. The current permissible concentration of the sum of phthalates in comestibles (4.0 mg/kg of original sample), including fats and oils, was exceeded in three pigs (50%) and one cow (17%).

The highest concentrations of the sum DBP + DEHP found within this study for combined feeds and animal fats were 1.12 mg/kg (chicken broiler mixture BR-2) and 6.92 mg/kg (porcine adipose tissue), respectively.

Combined feedstuffs are one of the major sources of contamination of food animals by phthalates cumulating predominantly in adipose tissues. Therefore, we regard the high concentrations of the sum DBP + DEHP in combined feedstuffs found within this study as warning.

The existence in the agricultural production of further sources of phthalates, such as plastics, paint coats or packaging materials, contributing to the overall burden of food animals and the contamination of animal products must be presumed owing to the wide use of phthalates in many industrial branches.

The widespread environmental contamination by PAEs, their adverse effects on live organisms and our findings of impermissible concentrations in adipose tissues of food animals rank them among topical hazardous contaminants also in the Czech Republic. Therefore, the activities should concentrate on 1) continuing detection of PAEs sources at farms and in feed processing plants and the food industry; 2) tests for PAEs of a representative number samples of feeds and animal products collected in various regions of the Czech Republic; 3) assessment of results of the tests referred to in point 2) with the objective to provide a reliable basis for drafting by legislative organs of the permissible concentration of PAEs in feedstuffs; 4) elaboration of measures aimed at the removal of PAEs risk to the food chain.

REFERENCES

- GAJDŮŠKOVÁ, V. – JAROŠOVÁ, A. – ULRICH, R. (1996): Occurrence of phthalic acid esters in food packaging materials. *Potrav. Vědy*, 14, 99–108.
- JAROŠOVÁ, A. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – RASZYK, J. – ŠEVELA, K.: Extraction of clean up for the determination by HPLC of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials. *J. Chromatogr. A* (in press).
- MATOUŠKOVÁ, O. – CHALUPA, J. – CIGLER, M. – HRUŠKA, K. (1992): *Stat Plus-manual*, version 1.01. 1st ed. Brno, Veterinary Research Institute. 256 p.
- ŠEVELA, K. – GAJDŮŠKOVÁ, V. (1996): Phthalic acid esters and human organism (in Czech). *Čas. Lék. Čes.*, 135, 679–682.
- SHARMAN, M. – READ, W. A. – CASTLE, L. – GILBERT, J. (1994): Levels of di-(2-ethylhexyl)phthalate and total phthalate esters in milk, cream, butter and cheese. *Food Addit. Contam.*, 11, 375–385.
- ŠEVELA, K. – GAJDŮŠKOVÁ, V. – HAVLÁT, F. – HAVRÁNKOVÁ, V. – JAROŠOVÁ, A. (1996): Phthalic acid esters in the peritoneal cavity patients treated by continuous ambulatory peritoneal dialysis (in Czech). *Vnitř. Lék.*, 42, 404–407.
- THOMAS, J. A. – NORTHUP, S. J. (1982): Toxicity and metabolism of monoethylhexyl phthalate and diethylhexyl phthalate: a survey of recent. *J. Toxic. Environ. Hlth.*, 9, 141–152.
- HEM-3524 – 10. 10. 1996. The Chief Hygienist of the Czech Republic, Document abr.

Received: 97–10–09

Accepted after corrections: 97–12–02

Contact Address:

MVDr. Josef R a s z y k, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Hudcova 70, 621 32 Brno, Czech Republic
Tel: +420 5 41 32 2 41, fax +420 5 41 21 12 29, e-mail: kahr@vuvet.anet.cz

CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFORMATION

This new bulletin is distributed free of charge by an e-mail to the members of FAO Veterinary Biotechnology Network in the Countries of Central and Eastern Europe (CENTAUR) and to anybody in the world who is registered. To subscribe CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFO send an e-mail to the editor: centaur<kahr@vuvl.anet.cz>. Previous issues are available from <http://www.clark.cz/vri/biotech.htm>. The content of the Newsletter covers biotechnological methods used in veterinary research and diagnostics, information about workshops and conferences, information from member's laboratories, advance contents of some scientific journal, namely from Elsevier production, recommended web sites and news from epidemiology of infectious diseases, etc. Sources of information are FAO, WHO, IAEA, OIE, EMPRES, AnimalNet, ProMED, AfroNETS, and the members themselves.

The objective of FAO CENTAUR Veterinary Biotechnology Network in the Countries of Central and Eastern Europe is to continue informal contacts between the participants of FAO workshops organized under the FAO TCP/RER/4551 Project "Regional Training in Veterinary Biotechnology for Improved Control

of Livestock and Poultry Diseases". These workshops have been oriented towards the vaccine production and modern diagnostic methods of infectious diseases. However, biotechnological methods and principles are widely used in all fields of veterinary medicine including the development and use of immunoassays in endocrinology, environmental analysis, recombinant antibodies, biosensors, etc. People working in all these fields should be well informed on news not only in their own discipline. Therefore biotechnology in CENTAUR project has no strict border and limitation. Efficient information technology represented by Internet overcomes all borders between countries and individuals. Although CENTAUR Network has been established for professionals from Poland, Slovakia, Hungary and the Czech Republic, who participated in the past FAO project, everybody can register himself or herself as a subscriber of CENTAUR Newsletter Flash Information and as a member of the CENTAUR Network. Thus CENTAUR activity is not limited by any border between countries or disciplines but it has to be based on the interest and activity of members.

CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFORMATION

je nový bulletin, zasílaný elektronickou poštou členům sítě FAO pro veterinární biotechnologii (FAO Veterinary Biotechnology Network in the Countries of Central and Eastern Europe CENTAUR) a dalším zájemcům z celého světa. Přináší zajímavosti o infekčních a neinfekčních onemocněních, novinky z molekulární biologie, informace o výskytu zvláště nebezpečných nálezů, BSE, CJD, o chřipce ptáků v Hongkongu, salmonelózách, virulentních *E. coli* a jiné aktuální zprávy. Čerpá ze zdrojů FAO, IAEA, OIE, WHO, informačních systémů ProMED, AfroNETS, EMPRES, AnimalNet aj. Dále přináší informace z pracovišť členů sítě, zprávy o připravovaných seminářích, kongresech, obsahy některých časopisů až tři týdny před jejich vydáním a upozornění na zajímavé domácí stránky ve World Wide Web. Zájemci se

mohou přihlásit k registraci na adrese: centaur<kahr@vuvl.anet.cz>. Dosud vydaná čísla je možné také získat na adrese <http://www.clark.cz/vri/biotech.htm>.

Prostřednictvím Národního koordinačního centra ve veterinární biotechnologii ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství v Brně a za spolupráce členů redakční rady z České republiky, Maďarska a Polska pokračuje FAO ve snaze modernizovat veterinární výzkum a diagnostiku v zemích střední Evropy. Očekává se aktivní vstup do sítě CENTAUR kolegů ze Slovenska, Slovinska, Litvy, Lotyšska, Estonska, Bulharska, Rumunska a Ukrajiny. CENTAUR NEWSLETTER FLASH INFORMATION však již našel svoje odběratele i v USA, Kanadě a Japonsku.

Karel Hruška

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 kurzívy, 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 imprimované vedoucím pracoviště nebo práce s prohlášením všech autorů, že se zveřejněním souhlasí.

Rozsah původních prací přesáhne 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měřových 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 požadovanou 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 zhodnocení práce, diskutuje se o možných nedostacích a výsledky se konfrontují s údaji publikovanými (požaduje se citovat jen ty autory, jejichž práce mají k publikované práci bližší vztah). Je přípustné spojení v jednu kapitolu 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 plné jméno (i spoluautorů), akademické, vědecké a pedagogické tituly a podrobnou adresu pracoviště s PŠČ, 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 43, No. 3, March 1998

CONTENTS

Nagy O., Michna A., Kováč G., Seidel H., Paulíková I.: The effect of respiratory diseases in calves on the blood gas values and acid-base balance	69
Lenhardt L., Dudriková E.: A densitometric analysis of alkaline phosphatase and aminopeptidase M in the jejunum enterocytes of the piglets with retarded growth (in English).....	75
Levkut M., Kolodzieyski L., Abdouislam O. E., Ševčíková Z., Ledecký V., Zibrín M.: An ultrastructure of cell death in a pig melanoma (in English).....	81
Fortýn K., Hruban V., Horák V., Tichý J.: Exceptional occurrence and extent of malignant melanoma in pig.....	87

PRELIMINARY COMMUNICATION

Raszyk J., Gajdůšková V., Jarošová A., Salava J., Palác J.: Occurrence of phthalic acid esters (PAEs) in combined feedstuffs and adipose tissues of swine and cattle (in English).....	93
--	----

INFORMATION

Hruška K.: Animal Production and Health Newsletter No. 27, Dec. 1997.....	92
Hruška K.: Revue Scientifique et Technique	92
Hruška K.: Centaur Newsletter Flash Information	96

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Ročník 43, č. 3, Březen 1998

OBSAH

Nagy O., Michna A., Kováč G., Seidel H., Paulíková I.: Vplyv ochorení respiračného aparátu u teliat na hodnoty krvných plynov a acidobázickú rovnováhu	69
Lenhardt L., Dudriková E.: Densitometrická analýza alkalickéj fosfatázy a aminopeptidázy M v enterocytoch tenkého čreva odstávaných v raste.....	75
Levkut M., Kolodzieyski L., Abdouislam O. E., Ševčíková Z., Ledecký V., Zibrín M.: Ultraštruktúra bunkovej smrti u melanómu ošípanej.....	81
Fortýn K., Hruban V., Horák V., Tichý J.: Výjimečný výskyt a rozsah maligného melanomu u praseta	87

PŘEDBĚŽNÉ SDĚLENÍ

Raszyk J., Gajdůšková V., Jarošová A., Salava J., Palác J.: Výskyt esterů kyseliny ftalové (PAE) v krmných směsích a tukové tkáni prasat a skotu.....	93
---	----

INFORMATION

Hruška K.: Animal Production and Health Newsletter No. 27, Dec. 1997.....	92
Hruška K.: Revue Scientifique et Technique	92
Hruška K.: Centaur Newsletter Flash Information	96

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, Bf. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1998

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