

ÚSTAV ZEMĚDĚLSKÝCH A POTRAVINÁŘSKÝCH INFORMACÍ

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Veterinary Medicine – Czech

ČESKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

1 2. března 1999

Ústav zemědělských  
a potravinářských informací  
ústřední zemědělská a lesnická knihovna  
Slezská 7, 120 56 Praha 2

3

VOLUME 44  
PRAHA  
MARCH 1999  
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 Horák, 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.,

Jílové 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: Agri, CAB Abstracts, Current Contents on Diskette – Agriculture, Biology and Environmental Sciences, Czech Agricultural Bibliography, Toxline Plus, WLAS.

**Periodicita:** Časopis vychází měsíčně (12x ročně), ročník 44 vychází v roce 1999.

**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, Česká republika. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Podrobné pokyny pro autory jsou v redakci a na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>.

**Informace o předplatném:** Objednávky na předplatné jsou přijímány pouze na celý rok (leden–prosinec) a zasílají se na adresu: Ústav zemědělských a potravinářských informací, vydavatelské oddělení, Slezská 7, 120 56 Praha 2. Cena předplatného pro rok 1999 je 696 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: Agri, 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 44 appearing in 1999.

**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, Czech Republic. Tel.: +420 2 24 25 79 39, fax: +420 2 24 25 39 38, e-mail: editor@login.cz. Detailed instructions for authors are available in the editorial office and at URL address <http://www.clark.cz/vri/Pokynya.htm>.

**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 1999 is 159 USD (Europe), 167 USD (overseas).

# DI-2-ETHYLHEXYL PHTHALATE AND DI-N-BUTYL PHTHALATE IN THE TISSUES OF PIGS AND BROILER CHICKS AFTER THEIR ORAL ADMINISTRATION\*

## DI-2-ETHYLHEXYL FTALÁT A DI-N-BUTYL FTALÁT VE TKÁNÍCH PRASAT A KUŘECÍCH BROJLERŮ PO ORÁLNÍM PODÁNÍ

A. Jarošová<sup>1</sup>, V. Gajdůšková<sup>1</sup>, J. Raszyk<sup>1</sup>, K. Ševela<sup>2</sup>

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

<sup>2</sup> *IInd Clinic of Internal Diseases, St. Ann's Faculty Hospital, Faculty of Medicine of Masaryk University, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** The distribution and cumulation of the most toxic phthalates di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP), were followed up in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral application. Besides, the presence of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP), a metabolite of DEHP, in the blood and urine was investigated. Phthalates were orally administered to pigs, at a dosage of 5 g each, daily, for 14 days (dissolved in edible oil and added to the first part of the feed), and to broilers at 100 mg each, daily (in a gelatine capsule) directly to the crop. In pigs, phthalates were analyzed in the liver, kidneys, lungs, brain, heart, muscle, renal and subcutaneous fats. While in broilers, they were examined in the muscle, skin, liver and mesenteric fat tissue. The analysis was performed just after the 14 days of application and then 14 and 28 days after the last day of phthalate application. During the experiment, the animals showed no clinical symptoms of disease. DEHP was present in the blood and urine of pigs, whereas broiler's blood was positive for MEHP. The lipophilic character of DEHP and DBP was confirmed. After 14 days of DEHP and DBP application, the highest concentration was found to be in the muscle and adipose tissue of the experimental pigs (DEHP: 1.22 and 1.43 in the muscle, 14.37 and 12.20 in the adipose tissue; DBP: 1.44 and 1.83 in the muscle, 9.42 and 9.64 in the adipose tissue – in mg/kg of the original sample). Total amount of DBP in broilers was eight fold less than DEHP. DBP was equally distributed in all the followed tissues, while DEHP was mainly accumulated in the fat tissue. After 14 days of application, DBP content in the skin was 0.9, muscle 0.19, mesenteric fat 3.13 and in the liver 0.27 mg/kg. DEHP content in the skin was 8.28, muscle 1.93, mesenteric fat tissue 18.20 and in the liver 0.32 mg/kg of the original sample (average from six experimental broilers). Fourteen and twenty eight days after the last application, a high persistence of both phthalates was detected in the body of broilers. The adipose tissue is the best indicator for the presence of phthalates in the organism. The tissues of control pigs and broilers contained both DEHP and DBP in detectable concentrations and also the presence of phthalates originating from the contaminated feed was confirmed. All samples collected from the feed mixtures currently available on the market, which were used for the feeding of experimental and control animals, contained DEHP and DBP (DEHP 0.24–1.77, DBP 0.06–2.37 mg/kg of feed). These are original results since phthalate fate in the body of livestock animals had not been studied previously. Confirmation of the presence and distribution of toxic phthalates in the body of livestock animals after peroral administration is very important for the safety of raw ingredients and animal food products.

phthalates; feed; distribution and cumulation; pigs; broiler chicks; analysis; biological material

**ABSTRAKT:** Po perorální aplikaci byla sledována distribuce a kumulace nejtoxičtějších ftalátů di-2-ethylhexyl ftalátu (DEHP) a di-n-butyl ftalátu (DBP) ve tkáních prasat a kuřecích brojlerů. V krvi a moči byl vedle DBP a DEHP sledován i mono-2-ethylhexyl ftalát (MEHP), metabolit DEHP. Ftaláty byly aplikovány *per os* po dobu 14 dní prasatům v dávce 5 g na kus a den (rozpuštěné v jedlé oleji a přidané do prvního podílu krmiva) a brojlerům v dávce 100 mg na kus a den (v želatinové tobolce) přímo do volete. Ftaláty byly analyzovány u prasat v játrech, ledvinách, plicích, mozku, srdci, svalovině, ledvinovém a podkožním tuku; u brojlerů ve svalovině, kůži, játrech a mesenterálním tuku, a to po 14denní aplikaci a dále za 14 a 28 dní od ukončení aplikace. Pokusná zvířata byla v průběhu pokusu bez klinických příznaků onemocnění. Po aplikaci DEHP byl zjištěn v krvi a moči prasat a v krvi brojlerů metabolit MEHP. Byl potvrzen lipofilní charakter DEHP a DBP. Po 14denní aplikaci DEHP a DBP byly nalezeny nejvyšší koncentrace ve svalovině a podkožním tuku pokusných prasat (DEHP: svalovina 1,22 a 1,43, podkožní tuk 14,37 a 12,20; DBP: svalovina 1,44 a 1,83, podkožní tuk 9,42 a 9,64 mg/kg původního vzorku).

\* Supported by the Czech Ministry of Agriculture (Project RE 5562) and Internal Grant Agency of the Czech Ministry of Health (Project No. 3429-3).

Kumulace DBP u brojlerů byla v průměru osmkrát nižší než DEHP. V těle brojlerů se DBP distribuoval rovnoměrně ve všech sledovaných tkáních, DEHP se kumuloval převážně v tukové složce. Po 14denní aplikaci byl obsah DBP v kůži 0,90, ve svalovině 0,19, v mesenterálním tuku 3,13 a v játrech 0,27 mg/kg původního vzorku, obsah DEHP byl v kůži 8,28, ve svalovině 1,93, v mesenterálním tuku 18,20 a v játrech 0,32 mg/kg původního vzorku (průměry ze šesti pokusných brojlerů). Za 14 a 28 dní od ukončení aplikace byla zjištěna vysoká perzistence obou ftalátů v těle brojlerů. Tukové tkáně jsou vhodnými indikátory při zjišťování obsahu ftalátů v organismu. Ve tkáních kontrolních prasat a brojlerů byly nalezeny měřitelné koncentrace DEHP a DBP a potvrzena kumulace ftalátů z kontaminovaného krmiva. Všechny vzorky komerčních krmných směsí, použité ke krmení pokusných a kontrolních zvířat, obsahovaly DEHP a DBP (DEHP 0,24 až 1,77, DBP 0,06 až 2,37 mg/kg krmiva). Dosažené výsledky jsou původní, osud ftalátů v těle hospodářských zvířat nebyl dosud studován. Potvrzení kumulace a distribuce toxických ftalátů v těle hospodářských zvířat po perorální aplikaci je významné z hlediska zdravotní nezávadnosti surovin a potravin živočišného původu.

ftaláty; krmiva; distribuce a kumulace; prasata; kuřecí brojlery; analýza; biologický materiál

## INTRODUCTION

Phthalic acid esters (PAE) are compounds which have been largely used in the chemical industry (because of their plasticizing and adhesive properties). However, they belong to the most hazardous environmental pollutants (Wams, 1987; Tan, 1995). PAEs from packaging materials can penetrate into food (Page and Lacroix, 1992; Nerin et al., 1993) whereas PAEs from PVC tubings used for health care purposes can migrate into the human body (Khalik et al., 1992; Plonavit et al., 1993). PAEs are non-genotoxic carcinogens. It has been demonstrated on laboratory animals (mice, rats, monkeys, guinea pigs) that they have embryotoxic and teratogenic effects (Hellwig et al., 1997; Ema et al., 1997), spermotoxic (Fukuoka et al., 1994; Zhou et al., 1990; Parmar et al., 1995), nephrotoxic (Crocker et al., 1988), hepatotoxic (Okita and Okita, 1992; Ganning et al., 1989) and/or carcinogenic ones (Klaunig et al., 1988; Eagon et al., 1994) and that they disturb membrane functions (Keller et al., 1991; Bojes and Thurman, 1994). In the recent years a proof was furnished of estrogenic effects produced by some phthalates (Jobling et al., 1995; Roy et al., 1997). The most common and toxic phthalates are di-2-ethylhexyl phthalate (DEHP) and di-n-butyl phthalate (DBP). The lipophilic character of the above phthalates and thus cumulation in the adipose tissue of biological materials are due to their chemical structure. Data about the cumulation of these esters in the organism are mostly encountered in the metabolic studies on laboratory animals (Chu et al., 1978; Albro and Lavenhar, 1989; Barron et al., 1989, 1995). So far there has not been any information obtained on these esters cumulation in organs and tissues of livestock animals. Phthalic acid diesters are equally metabolized in the organism regardless of the animal species. The hydrolase group is catalysed in the pancreas and GIT by means of esterase into biologically reactive monoester. During DEHP metabolism, there is a release of mono-2-ethylhexyl phthalate (MEHP) and 2-ethylhexanol, which is carcinogenic, active element in the oxidative phosphorylation and decrease of the ion-gradient in the mitochondria (Keller et al., 1991). Monoesters after being reabsorbed from the gastrointestinal tract to

the liver, kidney and urinary bladder, are metabolized by the isoenzymes cytochrome P450 into many oxidated metabolites. The amount of these metabolites and mode of excretion of PAE residues differ in various animals. For example rats excrete more metabolites through the urine, in a conjugated form (glucuronides) than monkey and man (Dirven et al., 1993; Keller et al., 1991; Albro and Lavenhar, 1989; Egestad et al., 1996). Barron et al. (1989, 1995), described similar metabolism in the bile of fishes.

The aim of this investigation was to study the distribution and cumulation of DEHP and DBP in the tissues of pigs and broiler chicks after the repeated oral administration, and assess PAE level in the body of livestock animals from the point of view of safety of food of animal origin.

## MATERIAL AND METHODS

### Chemicals

Phthalic acid esters (DEHP and DBP) from Merck Co (Germany) were used. The concentration of DEHP was 98% and that of DBP 99%. For PAE analysis in biological materials, we used standards with 99.9% purity, DEHP and DBP supplied by Supelco (USA). MEHP was synthesized at the University of Chemical Technology, Department of Organic Chemistry, Prague.

### Experiments – pigs

Phthalates application (DEHP and DBP) was followed in two independent experiments. In each experiment 6 piglets from the same litter of Large White breed (3 boars and 3 gilts) were used. Prior to the experiment, piglets were kept separately and later were put in the experimental room of the institute. DBP was applied in April and May, 1996, and DEHP in November and December, 1996. The weight of pigs before the experiment is given in Tab. III. Pigs were fed with commercial feeds according to the age category.

DEHP and DBP were dissolved in edible sunflower oil and added to the first portion of feed ration in the

morning feed at an amount of 5 g per head, daily. Phthalate was orally applied to four experimental pigs for 14 days. Two control pigs received sunflower oil. Before starting the experiment, 7 and 14 days after the application, blood samples (from the superior *vena cava*) and urine collected spontaneously were analyzed for DEHP, DBP, and MEHP presence. After 14 days of administration, two experimental and two control pigs were killed. The remaining two experimental pigs were fed with commercial feeds, and killed fourteen and twenty-eight days after the last day of phthalate application. Blood and urine samples were collected before slaughtering. After slaughtering, the following samples were collected for PAE analysis: liver (right lobe), kidney (right), lungs (right lobe), brain (right hemisphere), heart (right ventricle), muscle (caudal femoral muscles of the right lower limb), adipose tissue (subcutaneous tissue at the level of thoracic vertebrae and renal fat).

#### Experiment – broiler chicks

ISA Vedette broilers were bought from Ing. J. Kociana's farm in Brno. Prior to the experiment, broiler chicks were kept in the experimental room for a week so as to acclimatize. Later they were divided into groups, each group contained 6 broilers. All were kept in cages. The average broiler weight before the experiment was 750 g (Tab. V).

DEHP and DBP, each in a dose of 100 mg, were separately added to the contents of gelatinous capsules filled with the BR2 feed mixture for broiler chicks. The gelatine shells, typically enclosing medicinal drugs, were used in the experiment to administer the abovementioned, exactly weighed out quantity of a phthalate. Everyday, one capsule was applied to each of the experimental broilers directly to the crop before morning feed. The control group broilers received capsules filled with feed only.

Each phthalate was orally administered to 18 broilers for 14 days. After this treatment, six broilers were killed. Fourteen days after the last day of phthalate application, other six broilers were killed. The remaining six broilers were slaughtered twenty-eight days after the last application of a phthalate. Both DEHP and DBP experiments were performed simultaneously. Control animals were also 18, which were slaughtered with the same time interval as the experimental broilers. Experiments had been conducted in March and April, 1997.

Before slaughtering, animals were weighed and blood samples were collected by heart puncture for DEHP, DBP and MEHP analysis. Broilers were clipped without using hot water and samples were collected for PAE analysis. Livers were individually weighed and pooled samples were analyzed due to their small weight (six livers from each group). Muscle (pooled samples of breast and thigh muscles), skin (thoracic area), and mesenteric fat were examined for DEHP and DBP. In broilers, which were killed immediately after the phthalate

application, tissues (besides liver) and blood were used for the determination of DEHP and DBP. While in the rest (i.e. groups slaughtered 14 and 28 days after the last day of phthalate administration respectively) of broilers and the control group, the samples to be analyzed were prepared by pooling 6 individual samples of blood, muscle, skin and mesenteric fat in proportion to their respective mass values.

All samples of the feed mixtures used throughout our experiments on pigs and broiler chicks were controlled for DEHP and DBP content.

#### Applied methods

Tissue samples were immediately collected after the slaughtering. Then, they were homogenized, put in Petri dishes and left to freeze. Frozen samples and feed samples were lyophilized and subsequently PAE residues were extracted by *n*-hexane. PAE was separated from its co-extracts by means of gel permeation chromatography into gel Bio beads S-X3. To complete the cleaning of feed eluates, concentrated sulphuric acid was used. PAE was determined by high-performance liquid chromatography on Separon SGX C 18 with UV detection at 224 nm (diode array detector).

Blood samples were analyzed immediately after the collection. For the quick determination of blood DEHP, DBP and MEHP a procedure based on the extraction of PAEs by ethyl acetate was used. MEHP was extracted after DEHP and DBP by adding citrate buffer. The applied methods have been developed and validated by the same team of authors as referred below (Jarošová et al., 1998).

#### Determination of DEHP, MEHP and DBP in urine

Urine samples were examined immediately after collection. An amount of 250–500 ml of urine was diluted with the same quantity of distilled water. DEHP and DBP are extracted by 30, 20 and 20 ml of dichloromethane in a funnel. All the extracts are then concentrated in a heart-shaped flask on the rotary vacuum evaporator (water-bath temperature 40 °C), and are evaporated until dry under the pressure of a nitrogen stream. The evaporated substance is dissolved in 100–500 µl of acetonitrile for HPLC determination. After DEHP and DBP extraction, phosphoric acid was added to the urine solution to bring it to a pH of 2. Then, MEHP was extracted by dichloromethane using the same procedure mentioned previously. PAE determination by HPLC method is in accordance with PAE determination in blood (Jarošová et al., 1998). The limit of detection for DEHP, MEHP and DBP in urine is 1 µg/l. For a concentration of 2 µg/l of urine, the obtained PAE is ± R.S.D. (%) as follows: DEHP 98.0 ± 9.7; DBP 100.0 ± 10.1; MEHP 89.0 ± 10.9 (*n* = 8).

All feed and tissue samples were analyzed in triplicates, and blood and urine samples in duplicates. DEHP and DBP are found in tissues and calculated both in

I. Concentration of DEHP and MEHP in tissues (A = mg/kg extracted fat, B = mg/kg original sample) blood (ng/g whole blood), urine ( $\mu\text{g/l}$ ) of controls (C), experimental (E) pigs after 14 days of application (5 g per head, daily) and 14 and 28 days after the last application

Sample	Concentration of DEHP and MEHP <sup>+</sup>																						
	14 days of application – days														after the last application – days								
	0				7				14						14		28						
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4	E1		E2		E3	E4		C1		C2		E3		E4	
								A		B		B	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Muscle									29.58	1.22	23.51	1.43			2.43	0.10	1.65	0.09	13.20	0.48	4.88	0.46	
Renal fat									22.55	18.17	28.05	20.03			0.37	0.18	0.30	0.15	9.02	6.41	9.20	6.90	
Subcutaneous fat									19.21	14.37	18.24	12.20			0.68	0.42	<0.20	0.07	10.05	5.63	8.30	6.31	
Kidneys									1.40	0.12	3.29	0.31			<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	0.91	0.08	<0.20	<0.01	
Lungs									14.56	0.89	13.00	1.14			0.23	0.01	0.25	0.01	4.69	0.20	3.21	0.20	
Brain									0.37	0.03	0.21	0.02			0.22	0.02	<0.20	0.02	<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	
Heart									11.42	0.36	13.04	0.92			<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	7.09	0.31	<0.20	<0.01	
Liver									0.80	0.20	0.48	0.01			<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	0.15	<0.01	<0.20	<0.01	
										0.20 <sup>+</sup>		0.50 <sup>+</sup>				<0.01		<0.01 <sup>+</sup>		<0.01 <sup>+</sup>		<0.01 <sup>+</sup>	
Blood	<30	<30			<30	91	56	136	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	<30	
	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>			291 <sup>+</sup>	309 <sup>+</sup>	250 <sup>+</sup>	484 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	123 <sup>+</sup>	248 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	<30 <sup>+</sup>	
Urine	<1	<1			<1				<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	<1	
	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>			23 <sup>+</sup>	19 <sup>+</sup>	714 <sup>+</sup>	1354 <sup>+</sup>	163 <sup>+</sup>	161 <sup>+</sup>	900 <sup>+</sup>	670 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	<1 <sup>+</sup>	

Detection limit for DEHP in adipose tissues – 0.20 mg/kg, DEHP and MEHP<sup>+</sup> in tissues with low fat content – 0.01 mg/kg

Detection limit for DEHP and MEHP<sup>+</sup> in the blood – 30 ng/g of whole blood, in the urine 1  $\mu\text{g/l}$  of urine

II. Concentration of DBP in tissues (A = mg/kg extracted fat, B = mg/kg original sample), blood (ng/g whole blood), urine (µg/l) of controls (C) experimental (E) pigs after 14 days of application (5 g per head, daily) and 14 and 28 days after the last application

Sample	Concentration of DBP																					
	14 days of application – days																after the last application – days					
	0				7				14				14				14		28			
	E1	E2	E3	E4	E1	E2	E3	E4	E1		E2		E3	E4	C1		C2		E3		E4	
								A	B	A	B	B	B	A	B	A	B	A	B	A	B	
Muscle									22.80	1.83	28.40	1.44			0.38	0.05	1.28	0.02	17.20	1.04	8.34	0.46
Renal fat									0.24	0.19	0.19	0.11			0.30	0.19	0.10	0.06	0.37	0.30	0.85	0.77
Subcutaneous fat									10.20	9.64	10.00	9.42			1.15	1.09	0.29	0.20	2.40	2.04	2.40	2.01
Kidneys									2.50	0.05	1.68	0.04			1.34	0.05	0.92	0.02	1.82	0.04	1.21	0.02
Lungs									4.16	0.09	1.15	0.02			1.02	0.02	1.90	0.03	2.05	0.03	1.36	0.02
Brain									4.00	0.36	1.37	0.11			<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	5.66	0.48	1.36	0.12
Heart									5.18	0.18	1.29	0.02			1.32	0.02	3.92	0.08	7.53	0.32	10.27	0.38
Liver									3.33	0.07	0.51	0.02			<0.20	<0.01	<0.20	<0.01	2.55	0.11	0.76	0.04
Blood	<30				<30				<30		<30		<30	<30	<30		<30		<30			
Urine	<1				3				1		3		12		40		18		4		6	
	<1				3				1		3		12		40		18		4		6	

Detection limit for DBP in adipose tissues – 0.20 mg/kg, in tissues with low fat content – 0.01 mg/kg

Detection limit for DBP in the blood – 30 ng/g of whole blood, in urine 1 µg/l of urine

relation to the extracted fat amount (values in A) and to the original sample mass (values in B). In the case of feed and urine samples, PAE is calculated in relation to the original sample mass, while in blood samples PAE is calculated in relation to the whole blood. Since the MEHP metabolite appears to be a polar compound, its concentration in liver, blood and urine is calculated in relation to the mass of the original sample.

For the assessment of results the program STAT Plus, version 1.01 (Matoušková et al., 1992) was used. The following mathematico-statistical parameters were used in the paper: arithmetical mean, number of samples - *n*, standard deviation - S.D., significance level - *p* (when assessing the groups by Student's *t*-distribution test).

## RESULTS

During the experiment, animals showed no clinical signs of any disease. The distribution of DEHP, MEHP and DBP in the tissues, in the original sample, the phthalate level in the blood and urine of experiment and control animals at day 14 of application, and 14 and 28 days after the last day of administration are given in Tabs. I and II. During the 14 days of phthalate ap-

plication, DEHP was confirmed in the blood and urine by the presence of MEHP. The level of blood and urine DEHP and DBP in the samples was mostly below the detection threshold of the applied methods.

The weight values of organs (g) of the experimental and control pigs along with the values of the total body weight of pigs before the experiment and slaughtering are given in Tab. III.

The distribution of DEHP and DBP in the tissues and the results of blood analysis of broilers and control group at day 14 of application, and 14 and 28 days after the last application are summarized in Tab. IV. After 14 days of DEHP and DBP application, no phthalate residues were demonstrated in the blood of experimental broilers. Blood MEHP concentrations (detection threshold 30 µg/kg of blood) after 14 days of DEHP application varied from undetectable levels below 30 up to 223 µg/kg (< 30, < 30, < 30, 60, 150, 223).

Tab. V shows the average weight of liver (g), S.D. and average body weight (kg) of broilers before the experiment and killing. The only observed statistically significant difference in liver weight was between the control and experimental animals (*p* = 0.01) after 14 days of DBP application. However, no significant difference was observed in the total average body weights of experimental and control broilers.

III. Weight of organs (g) of killed pigs, total body weight (kg) of control (C) and experimental (E) pigs after 14 days of oral DEHP and DBP application (5 g per head, daily) and 14 and 28 days after the last application

Phthalate	Weight					
	after 14 days of application				after last application	
	E1	E2	C1	C2	14 days	28 days
DEHP					E3	E4
Organs (g)						
liver	1 170	900	980	960	790	1 100
kidney - right	100	100	95	100	70	105
kidney - left	105	100	100	100	70	105
heart	225	200	190	200	170	270
lungs	570	460	460	465	480	580
brain	110	80	80	90	90	90
Body weight (kg)						
before experiment	50	39	36	39	33	41
before slaughter	53	43	40	43	43	56
DBP						
Organs (g)						
liver	1 400	1 760	1 950	1 450	1 800	1 800
kidney - right	132	150	190	170	190	200
kidney - left	130	158	162	172	180	200
heart	375	385	465	405	260	510
lungs	685	560	620	850	1 230	950
brain	100	105	105	110	120	110
Body weight (kg)						
before experiment	65	80	110	90	100	117
before slaughter	80	90	120	100	110	135

IV. Concentration of DEHP, MEHP and DBP in tissues (A = mg/kg of extracted fat, B = mg/kg of original sample) and blood (ng/g whole blood) of control (C) and experimental (E) broilers after 14 days of oral application (100 mg DEHP or DBP per head, daily) and 14 and 28 days after the last application

Phthalate	Phthalate concentration											
	after 14 days of application				after the last application							
	E		C		14 days after				28 days after			
	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
DEHP												
Muscle	25.96 (11.32-44.30)	1.93 (0.84-3.30)	2.54	0.11	9.37	0.42	0.78	0.02	8.78	0.22	1.15	0.04
Skin	26.59 (9.95-41.79)	8.28 (3.41-14.34)	3.08	1.07	9.03	3.20	0.68	0.23	8.21	2.75	0.53	0.18
Adipose tissue	31.00 (14.99-48.94)	18.20 (8.80-28.73)	0.33	0.24	14.40	10.65	0.41	0.30	7.94	5.95	0.55	0.41
Liver	6.31	0.32	0.47	0.02	3.45	0.25	0.32	0.02	0.57	0.04	0.29	0.02
Blood		<30		<30		<30		<30		<30		<30
MEHP												
Liver		0.15		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01		<0.01
Blood		(<30-223)		<30		<30		<30		<30		<30
DBP												
Muscle	3.79 (2.36-7.05)	0.19 (0.12-0.35)	1.03	0.05	3.35	0.11	2.34	0.20	2.48	0.08	2.14	0.10
Skin	3.02 (2.22-4.88)	0.90 (0.64-1.41)	1.10	0.38	1.88	0.63	2.02	0.22	1.80	0.62	0.42	0.15
Adipose tissue	4.39 (3.59-5.54)	3.13 (2.56-3.95)	0.75	0.54	2.04	1.54	0.30	0.26	1.16	0.82	0.92	0.64
Liver	4.47	0.27	1.63	0.07	1.51	0.09	0.51	0.03	0.90	0.07	0.25	0.02
Blood		<30		<30		<30		<30		<30		<30

Detection limit for DEHP and DBP in adipose tissues - 0.20 mg/kg, for DEHP, MEHP and DBP in tissues with low fat content - 0.01 mg/kg  
 Detection limit for DEHP, MEHP and DBP in the blood - 30 ng/g of whole blood

V. Average liver weight (g) of slaughtered broilers and average body weight (kg) of experimental and control (C) broilers after 14 days of DEHP and DBP oral application (100 mg per head, daily) and 14 and 28 days after last application (n = 6)

Sample	Weight								
	after 14 days of application			after the last application					
				14 days after			28 days after		
	DEHP	DBP	C	DEHP	DBP	C	DEHP	DBP	C
Liver (g)									
mean	51.0	56.0*	49.0	67.5	59.3	63.5	90.8	75.0	82.5
S.D.	2.4	7.0	1.2	8.6	6.4	7.1	16.9	12.7	14.3
Average live weight (kg)									
before experiment	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75	0.75
before slaughter	1.65	1.65	1.62	2.65	2.90	2.70	3.80	3.65	3.70

\* p ≤ 0.01

The values of DEHP and DBP content (mg/kg feed) in the combined feed mixtures for pigs and broilers, which were used for feeding both experimental and control animals, are given in Tab. VI. All samples of commercial feeds were positive for phthalates, and the total DEHP and DBP concentration in most samples exceeded 1 mg/kg.

## DISCUSSION

The dosage of DEHP and DBP applied repeatedly *per os* to the pigs (5 g per head daily) and broilers (100 mg per head daily) was chosen in such a way so as to avoid intoxication, however to ensure measurable levels of phthalates in the analyzed organs and tissues.

VI. DEHP and DBP content (mg/kg of feed) of the feed provided to control and experimental pigs and broilers

Sample	Phthalate concentration		
	DEHP	DBP	Σ DEHP + DBP
1 - ČOS	0.49	0.45	0.94
2 - A1	0.24	0.47	0.71
3 - A2	0.35	0.61	0.96
4 - A3	0.44	0.66	1.10
5 - A3	0.34	0.32	0.66
6 - A3	0.45	0.52	0.97
7 - A3	0.33	0.96	1.29
8 - BR2	1.77	2.37	4.14
9 - BR2	0.24	0.06	0.30

Detection limit for DEHP and DBP - 0.02 mg/kg of feed

The common dosage of DEHP and DBP applied *per os* to rats is 1-3 g/kg of body weight (Thomas and Northup, 1982; Albro and Lavenhar, 1989). The dose of DEHP or DBP applied in our experiments was 20-60 fold less than that applied in rats.

The concentration of DEHP and DBP in the blood and urine of pigs during the 14 days of application (Tabs. I and II) was quite low, the values being distributed closely to the detection threshold of the applied methods. High exposure of an organism to DEHP can be confirmed by the analysis of blood and urine MEHP, which is formed very fast during DEHP metabolism in the gastrointestinal tract by the enzyme esterase (Dirven et al., 1993). This is supported by our results in Tab. I.

Similar results were obtained from the assessment of DEHP and DBP distribution in the organs and tissues (Tabs. I and II). The highest DEHP level was in the subcutaneous and renal fat, muscle, heart and lungs. DEHP amount in liver and kidney was low, probably due to MEHP formation, which was found in the liver at a concentration of 0.2 and 0.5 mg/kg after the 14-day-period of DEHP application. Fourteen and twenty-eight days after the last application, DEHP concentration in the organs decreased significantly. In muscle and adipose tissue the DEHP value decreased by about 50%. The highest DBP amount was in the muscle and subcutaneous tissue. While in the renal fat, it was significantly less when compared to DEHP. We have no explanation for this case. DBP, in comparison with DEHP, is uniformly distributed in the organs and tissues. Thus, we can assume that it has higher persistence in the organs and tissues than DEHP. Concerning the rate of DBP metabolism, its half-time elimination and specific metabolites (for example the monobutylester) no pharmacokinetic studies were available. The confirmation of lipophilic character of DEHP and DBP and their presence and distribution in tissues and organs in dependence on fat amount and DEHP or DBP persistence (values determined after 14 and 28 days from the application period in tissues and some organs) can be

considered as original results about phthalate cumulation in the body of pigs. Accordingly, the presence of toxic phthalates in the adipose tissue and muscle of pigs can be considered as an alarming situation from the point of view of food hygiene. After all, the said parts form the major edible portion of the slaughtered pig bodies.

Although the number of experimental pigs was limited (six piglets from one litter), and the individual variation in the cumulation and metabolical degradation of xenobiotics have to be accounted for, the obtained results provide sufficient information for general conclusions about the general DEHP and DBP distribution in the body of experimental pigs.

The investigation about the distribution of DEHP and DBP in broiler chicks was performed in broilers divided into groups, each containing six birds, including the control group. Daily, over a 14-days period, 100 mg phthalate were applied to each broiler. There was high cumulation of DEHP in the mesenterial fat, skin and muscle (Tab. IV) after its application. The DEHP level in the liver was low. MEHP concentration in the liver after 14 days of DEHP administration was 0.15 mg/kg of the original sample. Fourteen and twenty-eight days after the last application of DEHP, the amount of DEHP decreased in all examined tissues (Tab. IV). This is attributed to the formation of MEHP and the so called „diluting factor“ due to increased weight of broilers (Tab. V). Although equal dosage of DBP was applied orally, distribution results of DBP in the liver and tissues were significantly different from those of DEHP (Tab. IV). DBP cumulation was eight times lower than DEHP. DBP is equally distributed in adipose tissues, muscle and liver. Fourteen and twenty-eight days after the last application, there was a high DBP level due to the increased weight of broilers (Tabs. IV and V). The detected values in the muscle and skin indicate the persistence of DBP and its slow metabolism. No DEHP and DBP were detected in the blood of experimental and control broilers. In the analysed individual broiler's blood samples (slaughtered immediately after 14 days of DEHP application), MEHP level ranged from non-detectable concentration to 223 ng/g of whole blood (Tab. IV). Also, DEHP and DBP concentration in the tissues of these broilers had a wide range. The average and range of concentration of DEHP and DBP ( $n = 6$ ) in the tissues are given in Tab. IV. The variability in the tissue DEHP and DBP concentration and blood MEHP in the broilers of one group, is probably attributed to the various individual enzyme activities, and other body functions which are involved in the metabolism of xenobiotics and excretion of organism. During their study, Barron et al. (1995), confirmed the large difference in DEHP level in the tissues of fishes.

Difference in the distribution, cumulation and persistence of DEHP and DBP in the body of broilers and pigs could be caused by the different metabolism in mammals and birds, and partially due to distinct physico-chemical characters of both phthalates. DBP is a small

molecule with short unbranched chain, allowing its partial water solubility. While DEHP is water insoluble. Since the knowledge about the distribution and cumulation of DEHP and DBP in the tissues and organs of pigs and broilers is original, results could not be compared with other data. Facts about distribution and cumulation of phthalates are not extensive even in other species of animals. During DEHP application to rats (1 g/kg body weight for 35 days), residues of DEHP were detected in fat and liver. Its biological half-time is 1–2 days in the liver and 3–5 days in fat (Albro and Lavenhar, 1989). In long-term DEHP administration to monkeys, DEHP residues were present in the liver, fat, heart and testicles even 14 days after its last application (Thomas and Northup, 1982). Barron et al. (1995) proved the highest DEHP cumulation in the bile of fishes.

Experimental and control animals were fed on commercial feeds which contained DEHP and DBP (Tab. VI). In the most of the feed mixtures the concentration of summed DEHP and DBP exceeded 1 mg/kg of feed. According to Law No. 110/1997 on food and tobacco products and Ordinance No. 298/1997 by the Czech Ministry of Agriculture on food safety of various foods and ingredients, the maximum allowed phthalate amount (expressed as the sum of DEHP and DBP) in the muscle of livestock animals is 2 mg/kg of the original sample and 4 mg/kg in fats. The ratio between these concentrations does not correspond to the experimental level in the organism during the DEHP and DBP distribution in the tissues. From Tabs. I, II and IV it is obvious that when the concentration of DEHP in the muscle exceeds 1 mg/kg, its concentration in fat overpasses the limit 4 mg/kg. This reveals the incorrect stipulation of the phthalate limit in food and suggests a purely theoretical, inexact approach to the hygienic standards.

During the organ and tissue analysis of control pigs and broilers (Tabs. I, II, IV), measurable levels of DEHP and DBP were detected. In our case, contaminated feeds may be considered as the main source of phthalates, which may be contaminated in many ways. Besides this primary, most relevant source, dyes, paints, which are donors of high concentration of phthalates, could be regarded as secondary sources of contamination (i.e. plastics softened by DEHP up to the 40% of weight).

Results obtained in our study, concerning the distribution and cumulation of DEHP and DBP are valuable from the point of view of food safety and protection against toxic phthalates.

## REFERENCES

- Albro P. W., Lavenhar S. R. (1989): Metabolism of di(2-ethylhexyl)phthalate. *Drug Metab. Rev.*, 21, 13–34.
- Barron M. S., Schultz I. R., Hayton W. L. (1989): Presystemic branchial metabolism limits of di-2-ethylhexyl phthalate accumulation in fish. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 98, 49–57.
- Barron M. S., Albro P. W., Hayton W. L. (1995): Biotransformation of di(2-ethylhexyl)phthalate by rainbow trout. *Environ. Toxicol. Chem.*, 14, 873–876.
- Bojes H. K., Thurman R. G. (1994): Peroxisomal proliferators inhibit acyl CoA synthetase and stimulate protein kinase C *in vivo*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 126, 233–239.
- Chu I., Villeneuve D. C., Secours W., Franklin C., Rock G., Viau A. (1978): Metabolism and tissue distribution of mono-2-ethylhexyl phthalate in the rat. *Drug. Metab. Dispos.*, 6, 146–148.
- Crocker J. F., Safe S. H., Acott P. (1988): Effects of chronic phthalate exposure on the kidney. *J. Toxicol. Environ. Hlth.*, 23, 433–444.
- Dirven H. A. A. M., Broek van den P. H. H., Jongeneelen F. J. (1993): Determination of four metabolites of the plasticizer di(2-ethylhexyl)phthalate in human urine samples. *Inter. Arch. Occup. Environ. Health*, 64, 555–566.
- Eagon P. K., Chandar M., Epley M., Elm M. S., Brady E. P., Rao K. N. (1994): Di(2-ethylhexyl)phthalate-induced changes in liver estrogen metabolism and hyperplasia. *Int. J. Cancer*, 58, 736–743.
- Egestad B., Green G., Sjoberg P., Klasson-Wehler E., Gustafsson J. (1996): Chromatographic fractionation and analysis of mass spectrometry of conjugated metabolites of bis(2-ethylhexyl)phthalate in urine. *J. Chromatogr. B.*, 677, 99–109.
- Ema M., Harazono A., Miyawaki E., Ogawa Y. (1997): Embryo lethality during maternal exposure to dibutyl phthalate during early pregnancy in rats. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 58, 636–643.
- Fukuoka M., Kobayashi T., Hayakawa T. (1994): Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. VI. A possible origin of testicular iron depletion. *Biol. Pharm. Res.*, 9, 1648–1653.
- Ganning A. E., Olsson J. M., Elhammer A., Dallner G. (1989): The influence of di(2-ethylhexyl)phthalate on protein turnover in rat liver. *Toxicol. Lett.*, 48, 185–192.
- Hellwig J., Freudenberger H., Jáckh R. (1997): Differential prenatal toxicity of branched phthalate esters in rats. *Food Chem. Toxicol.*, 35, 501–512.
- Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K. (1998): Determination of phthalic acid esters (PAEs) in biological materials by HPLC. *Czech J. Food Sci.*, 16, 122–130.
- Jobling S., Reynolds T., White R., Parker M. G., Sumpter J. P. (1995): A variety of environmental persistent chemicals, including some phthalate plasticizers, are weakly estrogenic. *Environ. Hlth Perspect.*, 103, 582–587.
- Keller B. J., Liang D., Thurman R. G. (1991): 2-ethylhexanol uncouples oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. *Toxicol. Lett.*, 57, 113–120.
- Khalilq M. A., Alam M. S., Srivastava S. P. (1992): Implications of physico-chemical factors in the migration of phthalate esters from tubing commonly used to oral/nasal feeding. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 48, 572–578.
- Klaunig J. E., Ruch R. J., DeAngelis A. B. (1988): Inhibition of mouse hepatocyte intercellular communication by phthalate monoester. *Cancer Lett.*, 43, 65–71.

- Matoušková O., Chalupa J., Cigler M., Hruška K. (1992): STAT Plus uživatelská příručka, verze 1.01. 1. vyd. Brno, Výzkumný ústav veterinárního lékařství. 168 s.
- Nerín C., Cacho J., Gancedo P. (1993): Plasticizers from printing inks in a selection of food packagings and their migration to food. *Food. Addit. Contam.*, 10, 453-460.
- Okita R. T., Okota J. R. (1992): Effects of diethyl phthalate and other plasticizers on laurate hydroxylation in rat liver microsomes. *Pharm. Res.*, 9, 1648-1653.
- Page D. B., Lacroix G. M. (1992): Studies into the transfer and migration of phthalate esters from aluminium foil-paper laminates to butter and margarine. *Food Addit. Contam.*, 9, 197-212.
- Parmar D., Srivastava S. P., Singh G. B., Seth P. K. (1995): Testicular toxicity of di(2-ethylhexyl)phthalate in developing rats. *Vet. Human Toxicol.*, 37, 310-313.
- Plonavit S. L., Nau H., Maier R. F., Wittfoht W., Obladen M. (1993): Exposure of new-born infants to di(2-ethylhexyl)phthalate and 2-ethylhexanoic acid following exchange transfusion with polyvinylchloride catheters. *Transfusion*, 33, 598-605.
- Roy D., Palangal M., Chen CH. W., Thomas R. D., Colerangle J., Atkinson A., Yan Z. J. (1997): Biochemical and molecular changes of the cellular level in response to exposure to environmental estrogen-like chemicals. *J. Toxicol. Environ. Hlth*, 50, 1-29.
- Tan G. H. (1995): Residue level of phthalate esters in water and sediment samples from the Klang River basin. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 54, 171-176.
- Thomas J. A., Northup S. J. (1982): Toxicity and metabolism of monoethylhexyl phthalate and diethylhexyl phthalate: a survey of recent literature. *J. Toxicol. Environ. Hlth*, 9, 141-158.
- Wams T. J. (1987): Diethylhexylphthalate as an environmental contaminant - a review. *Sci. Total Environ.*, 66, 1-16.
- Zhou Y., Fukuota M., Tanaka A. (1990): Mechanism of testicular atrophy induced by di-n-butyl phthalate in rats. Part 3. Changes in the activity of some enzymes in the Sertoli and sperm cells, and in the levels of metal ions. *J. Appl. Toxicol.*, 10, 447-453.

Received: 97-12-08

Accepted after corrections: 98-10-12

---

**Contact Address :**

Ing. Alžběta Jarošová, Mendelova zemědělská a lesnická univerzita, Ústav technologie potravin, Zemědělská 1, 613 00 Brno, Česká republika  
Tel. +420 5 45 13 31 91, fax +420 5 45 21 20 44

---

# DEVELOPMENT OF A SENSITIVE RADIOIMMUNOASSAY FOR IGF-I DETERMINATION IN SAMPLES FROM BLOOD PLASMA AND CELL-CONDITIONED MEDIUM

## ROZPRACOVANIE CITLIVEJ RADIOIMUNOANALÝZY PRE STANOVENIE IGF-I VO VZORKÁCH KRVNEJ PLAZMY A BUNKAMI KONDICIOVANÉHO MÉDIA

A. Makarevich, A. Sirotkin

*Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** This paper describes the development of a versatile non-equilibrium RIA for measurement of IGF-I concentrations in animal samples obtained from both *in vivo* and *in vitro* sources. Assay parameters for this IGF-I RIA indicated that the assay is accurate (96.2% of IGF-I recovery), precise (intra- and interassay coefficients of variation < 10 and 16% resp.) and sensitive (0.1 ng/ml at the 95% confidence limit). Determination of IGF-I concentration in blood plasma of sheep and nutria, serum of adult goat and bovine fetuses, as well as in bovine and nutria granulosa cell-conditioned medium demonstrated the validity of this assay system. From the results, we conclude that this IGF-I assay will be useful for analysis of samples obtained from *in vivo* or *in vitro* systems.

IGF-I; radioimmunoassay; blood plasma; cell incubate; nutria; cow; goat; sheep

**ABSTRAKT:** Táto práca popisuje rozpracovanie neekvilibrovanej metódy RIA pre všestranné stanovenie IGF-I vo vzorkách zvierat získaných v pokusoch *in vivo* alebo *in vitro*. Vyhodnotenie parametrov analýzy ukazuje, že táto metóda má vyhovujúcu presnosť (odhaliteľnosť IGF-I vo vzorkách 96,2 %), presnosť (vnútri- a medziskupinové variačné koeficienty < 10, resp. 16 %) a citlivosť 0,1 ng/ml pri 95% dôveryhodnosti). Použitelnosť metódy bola preukazná pri stanovení koncentrácie IGF-I v krvnej plazme ovčie a nutrií, krvnom sére dospelých kôz, fetálnom tefacom sére, a taktiež v médiu kondiciovanom granulóznymi bunkami kráv a nutrií. Výsledky testov ukazujú, že táto procedúra môže byť vhodná pre analýzu vzoriek získaných pri experimentoch *in vivo* aj *in vitro*.

IGF-I; radioimmunoassay; krvná plazma; bunkový inkubat; nutria; krava; ovca

### INTRODUCTION

Growth factors are the main stimulators of cell proliferation and secretory activity, and furthermore have been shown to increase body weight, meat and milk production and reproduction in animals and humans.

The most recognized member of the growth factor family is insulin-like growth factor I (IGF-I), which was isolated and sequenced from amniotic fluid by Rinderknecht and Humbel (1978). IGF-I is a low-molecular weight peptide (MW 7500), whose structure and effects are similar to proinsulin and insulin. The production of IGF-I has been reported in various tissues including ovarian granulosa cells from cattle (Spicer et al., 1993) pig (Hammond et al., 1991), rabbit (Herrler et al., 1992) rat (Hernandez et al., 1988) and human (Giudice, 1992; Sirotkin and Schaeffer, 1995), as well as oviductal cells of cattle (Schmidt et al., 1994; Makarevich and Sirotkin, 1997) and pig (Lee et al., 1992). Moreover, the presence of IGF-I has also been documented in human blood serum (Blum et al., 1992),

bovine milk (Schams, 1994), ovarian follicular fluid of cattle (Spicer et al., 1988), pig (Hammond, 1981) and sheep (Basiouni et al., 1994) as well as porcine oviductal fluid (Wiseman et al., 1992).

Synthesis of IGF-I in the ovary and other tissues is regulated by growth hormone, gonadotropins and steroids (Giudice, 1992; Hammond et al., 1991), suggesting that IGF-I may be the messenger between the classical endocrine system and animal production. Due to the important role of IGF-I, the development of a sensitive assay for the IGF-I is necessary. At present, sufficiently sensitive and acceptable IGF-I assay for both *in vivo* and *in vitro* samples has not been developed yet. Most commercial kits for the determination of IGF-I concentration are intended mainly for measurement in blood plasma or serum (*in vivo* system), where these levels are relatively high. The IGF-I concentrations in conditioned media are 10–100 times lower than in blood or plasma, making the use of existing commercial kits invalid. Thus, the development of an assay, which could measure low IGF-I concentrations in the

samples produced from *in vivo* or *in vitro* sources, is needed. In the present study, we developed a sensitive radioimmunoassay (RIA), which enabled us to determine the IGF-I concentrations in both blood and cell-conditioned medium.

## MATERIAL AND METHODS

### Reagents

All inorganic components used for preparation of assay buffers and salt solutions, if not specified otherwise, were purchased from Lachema (Brno, Czech Republic).

Human recombinant IGF-I (MW 7500) was purchased from Sigma (St. Louis, USA); rabbit anti-human IGF-I antiserum (UB2-495) was kindly provided by L. Underwood and J. Van Wyk (University of North Carolina, Chapel Hill); carrier-free NaI<sup>125</sup> (tracer) was provided by Lacomed (Prague, Czech Republic); swine anti-rabbit antiserum (SwAR/G RIA) was purchased from Sevac (Prague, Czech Republic). Normal rabbit serum from non-cycling New-Zealand rabbit females was kindly provided by Dr. J. Rafay (Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovakia). Fetal calf heat-inactivated serum was purchased from Sigma.

### Preparation of I<sup>125</sup>-labelled IGF-I (tracer)

I<sup>125</sup>-labelled IGF-I was prepared by a chloramine T procedure (Wilson & Miles, 1977) modified as follows:

1 m Ci or 0.5 m Ci of carrier-free NaI<sup>125</sup> was added to 10 µg of human recombinant IGF-I diluted in 20 µl of 0.2M phosphate buffer, pH 7.4 (with phenol red). The reaction was initiated by addition of 40 µg of chloramine T (Fluka, Buchs, Switzerland) in 10 µl of deionized water and stopped after 60 sec with 10 µl of sodium metabisulphite (5 mg/ml in 0.2M-phosphate buffer). The reaction mixture was brought up to 100 µl with phosphate buffer containing phenol red and fractionated immediately on a GlasPac Column 0.8 cm x 30 cm (LKB, Bromma, Sweden) of Sephadex G-50 fine (Sigma). Collection of the labelled IGF-I fractions (MW > 7648) was completed when the phenol red (MW 366) reached the bottom of column. The presence of labelled ligand in eluate fractions was determined by TCA- (trichloroacetic acid) test (Wilson and Miles, 1977).

### Sample preparation

#### *In vivo* samples

The samples of nutria blood plasma were kindly provided by D. Mertin (Department of Fur Animals, Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovakia). Venous blood was collected from *arcus venosus dorsalis digitalis* of females from control group (normal

diet) and experimental group (food restriction up to 1/3 normal diet) before (day 1), during (days 3 and 5) and at the end (day 7) of food restriction period. Plasma was collected after addition of 5% sodium citrate solution followed by a 30 min centrifugation at 2 000 g at 4 °C.

The samples of sheep blood plasma were kindly provided by A. Gladycz (The Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Jablonna, Poland). The jugular vein of non-cycling Polish Lowland ewes was cannulated 24 hours before blood collection. Blood samples were collected at 15 min intervals over 4 hours and centrifuged at 2 000 g at 4 °C. Goat serum was prepared from the blood of adult Angora goat as described previously (Makarevich et al., 1994).

#### *In vitro* samples

For *in vitro* samples, we collected medium DME/F 12 conditioned by bovine granulosa cells, that was prepared as described previously (Sirotkin and Nitray, 1994).

After *in vivo* experiment nutria were slaughtered and the recovered ovaries were used for the *in vitro* study. Ovarian granulosa cells were isolated from the preovulatory ovarian follicles by aspiration and cultured in 24-well plates (Becton Dickinson, Heidelberg, Germany) in the DME/F 12 culture medium (Sigma) for 3–4 days. Afterwards, the incubation medium was collected by careful aspiration and stored as described below.

Immediately after collection, samples of blood plasma (100 µl), serum (100 µl) or conditioned medium (500 µl) were mixed with 20 µl of 2.5% Triton X100 (Serva, Heidelberg, Germany) in deionized water to inhibit protease activity and stored at –20 °C until use. Before IGF-I determination, the samples were thawed at room temperature, and IGF-I was separated from the binding proteins by the following extraction-neutralization procedure: 100 µl of sample was added to 400 µl of acid-ethanol solution (87.5% of ethanol + 12.5% 2N HCl, v/v) for 30 min and centrifuged at 2 500 g for 60 min. Then 100 µl of the supernatant was neutralized by adding of 200 µl of 0.855M Tris-base (Sigma).

RIA was carried out by using the assay buffer, pH 7.4 containing 0.03M sodium phosphate (monobasic, Sigma), 0.02% protamin sulphate (grade I, Sigma), 0.02% sodium azide (Merck, Darmstadt, Germany), 0.01M EDTA (Serva), and 0.05% Tween 20 (Sigma).

### RIA procedure

A non-equilibrium assay procedure (Furlanetto et al., 1977, with our modifications) was carried out as follows: 100 µl of standards (human recombinant IGF-I diluted with the assay buffer to 100, 50, 25, 10, 1, 0.1 ng/ml) or sample extracts, in triplicates, were added into assay tubes. Since expected concentrations of IGF-I in plasma are higher than the highest standard concentration given in our assay (100 ng/ml), plasma samples were diluted 1 : 20 in assay buffer. Thereafter, 100 µl of a specific antiserum (rabbit anti-human IGF-I

antiserum UB2-495) at working dilutions ranging from 1 : 5 000 to 1 : 240 000 was added into the plastic tube. This antiserum at the dilution 1 : 18 000 exhibited 1.5–1.9% cross-reactivity towards IGF-II and negligible cross-reactivity with EGF and GH. After incubation at room temperature for 1 day, 100  $\mu$ l of NaI<sup>125</sup>-IGF-I in the assay buffer was added to give a final radioactivity of 20 000–120 000 cpm/tube. After a further 24 h incubation, the complex ligand/antiserum was precipitated using a 1 h incubation with reaction mixture containing 100  $\mu$ l of swine anti-rabbit antiserum (SwAR/G RIA, precipitating antiserum) diluted to 1 : 15 with assay buffer and 100  $\mu$ l of normal rabbit serum (NRS) diluted 1 : 50. To enhance the separation between bound and unbound radiolabelled ligands, the precipitated complex was sedimented after a 20 min incubation with 500  $\mu$ l of 17% PEG 6000 (Fluka, Switzerland) and subsequent 20 min centrifugation at 2 500 g.

For cell-conditioned medium, normal rabbit serum at the dilutions 1 : 10 to 1 : 100 was added to the mixture with precipitating antiserum, to promote separation of bound and unbound fraction.

Radioactivity was measured using a gamma-counter Cobra 2001 (Canberra-Packard, Meriden, USA) with automatic estimation of IGF-I concentration in ng/ml.

## RESULTS AND DISCUSSION

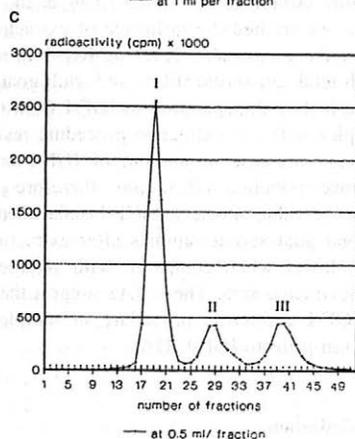
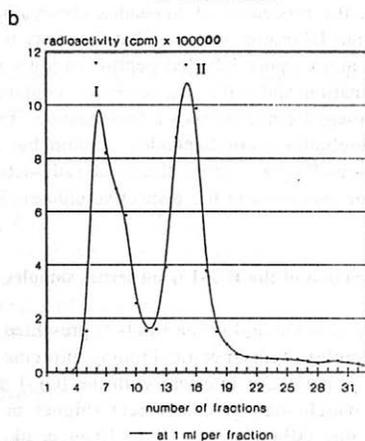
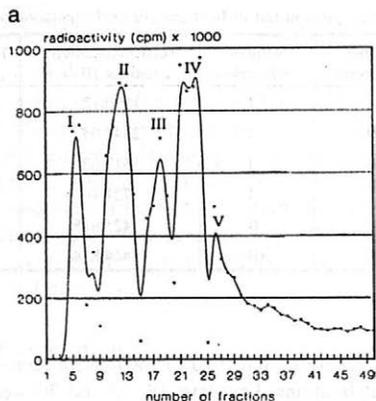
### Evaluation of labelling technique

The chloramine-T technique used in our procedure was found to be successful for IGF-I labelling. This technique provided a high yield of peptide-isotope binding (specific activity 74.6  $\mu$ Ci/ $\mu$ g), as determined by TCA precipitation test.

We tested two concentrations of I<sup>125</sup>-sodium to select the appropriate dose for optimal iodination of IGF-I peptide. At a dose of 40 MBq (1 mCi), a 50% of isotope was incorporated probably due to a disbalance between ligand and isotope amounts. Consequently, excessive NaI<sup>125</sup> passed through the column as a free isotope (4th and 5th peaks, Fig. 1a.; 2nd peak, Fig. 1b). When a lower amount of isotope was used for the labelling, the first peak labelled IGF-I product was prevalent, and less than 20% of isotope appeared to be unbound (Fig. 1c).

### The evaluation of <sup>125</sup>I IGF-I purification procedure

The ratio of bound radioactivity (labelled peptide) to total radioactivity after gel separation at the NaI<sup>125</sup> activity of 20 MBq or 0.5 mCi (Fig. 1c) are presented in Tab. I. Gel-filtration allowed the collection of the labelled IGF-I product in fractions 18–20, which corresponded to the first peak of radioactivity. The activity of labelled IGF-I in eluate was 0.33 mCi (or 4.5  $\mu$ g/ml, as determined by TCA precipitation test). Approxi-



I. Purification of <sup>125</sup>I-labelled IGF-I by gel filtration on Sephadex G-50:

a: <sup>125</sup>I-iodine at dose of 40MBq (1 mCi); the peaks of radioactivity are mean: I – labelled IGF-I associated in complex with BSA molecules, II – pure <sup>125</sup>I – labelled IGF-I, III – degraded <sup>125</sup>I-IGF-I products, IV and V – free isotope

b: <sup>125</sup>I-iodine at dose of 40MBq (1 mCi); the peaks of radioactivity are mean: I – pure <sup>125</sup>I-labelled IGF-I, II – free isotope

c: <sup>125</sup>I-iodine at dose of 20MBq (0.5 mCi); the peaks of radioactivity are mean: I – pure <sup>125</sup>I-labelled IGF-I, II – labelled products of IGF-I degradation, III – free isotope

I. TCA-precipitation test of fractions after gel separation on column with Sephadex G50

Number of fraction	Number of peak	Total radioactivity (cmp x 10 <sup>-3</sup> )	TCA precipitate (bound radioactivity), (n = 4) (%)	<sup>125</sup> I-IGF-I in fractions (0.5 ml) (µg)
18	I	1590.12	97.6 ± 6.4	1.9
19	I	2547.05	98.0 ± 8.9	3.04
20	I	1613.62	94.8 ± 5.2	1.87
21	I	721.103	93.8 ± 9.8	0.82
29	II	425.615	12.1 ± 1.5	0.106
40	III	444.818	5.3 ± 0.15	0.046

mately 7.7 µg of IGF-I (0.57 mCi) were recovered in purified fractions. Fractions 18, 19 and 20 were used for RIA.

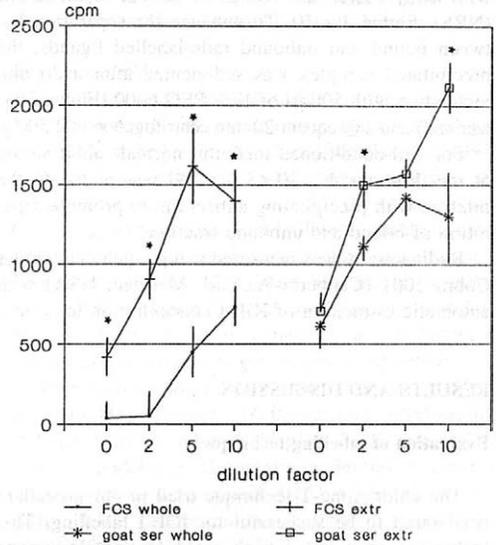
Thus, the procedure of Sephadex chromatography, used in our laboratory, assures that the assay is started with an almost pure labelled peptide product without overiodination and with practically no contamination with damaged components of free isotope. The final yield of eluates from Sephadex column has always been about 95–98% from the total radioactivity of <sup>125</sup>Iodine presented in the respective eluates (Tab. I).

The extraction of the IGF-I from serum samples

IGF-I in blood and tissue fluids is presented mainly as a complex with specific binding proteins. These binding proteins can interfere with the IGF-I determination, which may give incorrect (higher or lower) IGF-I value (Blum et al., 1992; Bang et al., 1994). Therefore, we studied the influence of extraction procedure on the measurable level of IGF-I in samples from both fetal calf serum (FCS) and adult goat serum. As shown in Fig. 2, separation of IGF-I from the protein complex with our extraction procedure resulted in a significant increase of amount of IGF-I-antibody-bound tracer (labelled IGF-I, cpm), therefore suggesting that actual value of detected IGF-I (unlabelled IGF-I) in FCS and goat serum samples after extraction procedure is lower when compared with samples from whole unextracted sera. These data suggest the necessity of IGF-I extraction procedure in samples from blood serum prior to IGF-I RIA.

Assay optimisation

The optimal concentration of the tracer for the assay was determined by preliminary incubation of decreasing amounts of labelled IGF-I in the range from 240 000 cpm to 20 000 cpm in the presence of decreasing dilutions of antiserum (from 1 : 5 000 to 1 : 200 000). As shown in Fig. 3a, the decrease of tracer concentration (total radioactivity – T) in the presence of the antiserum at dilutions of 1 : 5 000 or 1 : 10 000 resulted in an



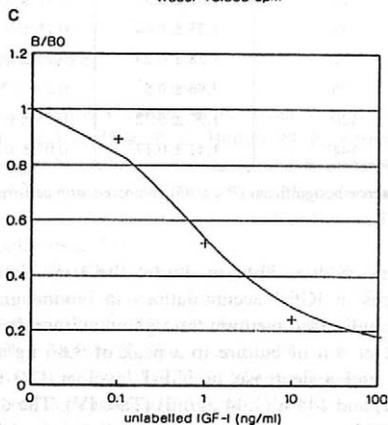
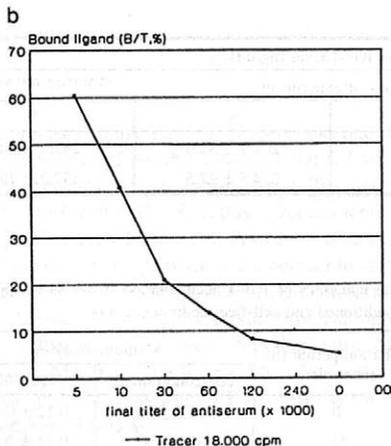
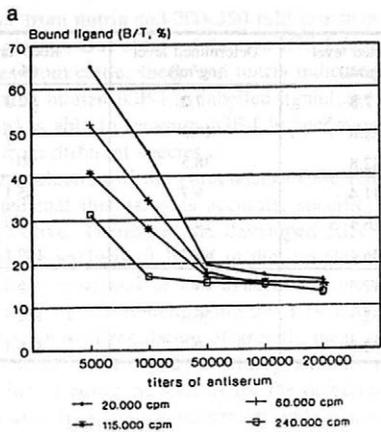
2. The influence of extraction procedure on labelled IGF-I/IGF-I antibody binding in serum samples

FCS whole – fetal calf serum without extraction  
 FCS extr – extracted samples of fetal calf serum  
 goat ser whole – adult goat serum without extraction  
 goat ser extr – extracted samples of adult goat serum

\* significant differences (*P* < 0.05) with parallel groups in non-extracted control (FCS whole and goat serum whole)

increase in bound radioactivity (B/T). Moreover, detectable differences in ligand binding were observed at different dilutions of antiserum. Higher ligand binding (65.5%) was observed at a dilution of 1 : 5 000, whereas dilutions at 1 : 50 000, 1 : 100 000 and 1 : 200 000 decreased percentage of bound ligand to less than 20%. The ligand binding under these conditions was not dependant on tracer concentration.

The results of the testing of antiserum binding at different dilutions with tracer at dose of 18 000 cpm (the effective dose determined in the previous test) are shown in Fig. 3b. It was demonstrated that the antiserum at dilution of 1 : 10 000 provided as much as



3. The influence of labelled ligand (tracer), unlabelled ligand and antiserum concentrations on optimal ligand/antiserum binding:

a: the results of ligand binding with different amounts of tracer (20 000, 60 000, 115 000 and 240 000 cpm) and IGF-I-antiserum; unlabelled IGF-I was omitted (zero standard)

b: the results of ligand binding with optimal dose of tracer (18 000 cpm) and different titers of IGF-I-antiserum; unlabelled IGF-I was omitted (zero standard)

c: the results of ligand binding (calibration curve) with optimal doses of the tracer (18 000 cpm) and antiserum dilution (1 : 10 000) in the presence of logarithmically increasing amounts of unlabelled ligand

42% of ligand binding at the zero standard and showed a correct slope of calibration curve for the assay (Fig. 3c). These observations demonstrate the influence of concentration of both tracer and antiserum on RIA results. The optimal concentration of the  $I^{125}$ -IGF-I and anti-IGF-I antiserum is shown to be near the 18.000 cpm at the dilution of 1 : 10 000, respectively.

The reliability of the RIA for determination of IGF-I, as standardised in our laboratory, was evaluated by its specificity, non-specific binding (NSB), sensitivity, accuracy and precision.

#### Antiserum specificity

Cross-reactivity of anti-IGF-I antiserum with IGF-II was 1.5–1.9%. Our tests for EGF and bGH indicated negligible cross-reactivity.

#### The non-specific binding (NSB) in reaction system

In our work, we studied effect of rabbit serum (NRS) and tracer concentration on non-specific binding. We observed, that NRS increased separation between bound complex and unbound tracer and reduced non-specific binding from 7.3% to 4.7% at the tracer activity of 25 000 cpm/tube. NSB in our assay was not influenced by tracer concentration and, in the presence of normal rabbit serum (1 : 25), it did not exceed 6% (data not shown).

#### Assay sensitivity

When tracer at the activity of 18 000 cpm and antiserum at the dilution of 1 : 10 000 were given in the assay, the lowest detectable level of IGF-I that can be distinguished from the zero standard was 0.128 ng/ml at the 95% confidence limit (data not shown).

#### Assay accuracy

The accuracy in our assay was determined by recovery of added IGF-I (Tab. II).

Accuracy, as determined in 9 recovery experiments, was examined and shown to be excellent. The percentage of recovery of IGF-I in samples after addition of exogenous IGF-I varied between 84.6 and 116% with an average 96.2%. The correlation coefficient ( $r$ ) between the theoretically and determined values of IGF-I was 0.982, indicating a high level of accuracy.

#### Assay precision

As determined from the mean of 10 replicate samples (data not shown), intraassay coefficient of variation did not exceed 10%, whilst interassay coefficient of variation did not exceed 16%. These data demonstrate appropriate precision of the assay.

## II. Recovery of added IGF-I from samples with endogenous IGF-I

Number of sample	Endogen. IGF-I in medium (ng/ml)	IGF-I added (ng/ml)	Expected level (ng/ml)	Determined level (ng/ml)	Recovery (%)
1	2.8	5	7.8	7.2	92.3
		20	22.8	19.3	84.6
		40	42.8	38.5	90
2	6.4	5	11.4	9.7	85.1
		20	26.4	24	90.9
		40	46.4	49.7	107.1
3	12.3	5	17.3	15	86.7
		20	32.3	36.4	112.7
		40	52.3	60.7	116.1

$r = 0.982$

## III. Effect of food restriction on plasma IGF-I level in nutria

Experimental groups	Plasma IGF-I level (ng/ml)			
	days of experiment			
	1	3	5	7
Control (normal food)	247.7 ± 31.1	230.4 ± 32	204.7 ± 37.6	297.4 ± 30.7
Food restriction	234.8 ± 30.1	270.8 ± 16.3	234.5 ± 27.5	157.2 ± 48*

\* difference is significant ( $P < 0.05$ ) compared with control

## Measurement of IGF-I in samples

Human IGF-I is assumed to be suitable as a tracer or standard for the determination of IGF-I in other species because of the extremely high homology in protein and amino acid sequences between IGF-I molecule of human and other mammals (Jansen et al., 1983; Francis et al., 1989a, b; Fotsis et al., 1990). To evaluate the suitability of human IGF-I for the measurement of IGF-I in species others than human, we attempted to analyze samples from cattle, sheep and nutria (both from *in vitro* or *in vivo* experiments) using human IGF-I as labelled ligand and protein standard. In our *in vivo* experiments we analyzed samples of blood plasma collected from nutria kept under the conditions of food restriction. As shown in Tab. III, our RIA system was able to measure IGF-I in nutria plasma, as well as to indicate differences in IGF-I levels between nutria kept under the conditions of normal feeding (control) and of food restriction. It was observed that food deprivation initially increased IGF-I plasma concentrations until day 3 (with no significant difference with control), afterwards IGF-I was gradually decreased from 3rd to 7th day of starvation period. At the end of the experiment a significant difference ( $p < 0.001$ ) compared to control (animals without food restriction) was found.

Our RIA was able to detect IGF-I in sheep plasma samples at concentrations ranging from 540 to 995 ng/ml (data not presented).

We analyzed IGF-I in media after incubation with bovine and nutria granulosa cells (conditioned media).

## IV. The dynamics of IGF-I accumulation in the bovine granulosa cell-conditioned and cell-free medium (ng/ml)

Incubation period (h) (control)	Medium analysed	
	cell-conditioned	cell-free
0	0.12 ± 0.003	0.12 ± 0.003
24	1.67 ± 0.5*	0.17 ± 0.0034
48	1.25 ± 0.44*	0.15 ± 0.15
72	1.38 ± 0.29*	0.22 ± 0.033
96	3.86 ± 0.5*	0.2 ± 0.2
120	1.90 ± 0.32*	0.15 ± 0.15
144	1.44 ± 0.17*	0.05 ± 0.05

\* difference is significant ( $P < 0.05$ ) compared with cell-free control

Our assay was able to detect the time dependent changes in IGF-I accumulations in bovine granulosa cell-conditioned medium throughout culture: from 0.12 ng/ml at 0 h of culture to a peak of 3.86 ng/ml after 96 h and a decrease in IGF-I level at 120 h (1.90 ng/ml) and 144 h (1.44 ng/ml) (Tab. IV). The decrease of IGF-I concentration in the medium after 96 h of culture may be due to utilisation by cells and/or due degradation. The non-specific binding found in the blank control (cell-free medium) may be due to a some cross-reactivity of IGF-I antiserum with peptides others than IGF-I.

These results show that the samples obtained from *in vitro* system (medium conditioned by bovine and nutria granulosa cells) exhibited about 80-100-fold less IGF-I immunoreactivity when compared with *in vivo*

samples from nutria and 200-350-fold less than that of sheep plasma. Our obtained data on IGF-I detection in samples from cattle, sheep and nutria indicate that our RIA using human IGF-I as labelled ligand and protein standard is able to measure IGF-I in specimens originated from different species.

The evaluation of the parameters of the IGF-I RIA indicated that this assay is accurate, specific, precise and sensitive. Therefore, the developed RIA may be utilized for analysis of IGF-I in the samples of blood plasma (*in vivo*) and of cell-conditioned medium (*in vitro*). IGF-I measurement using this RIA may be useful for studies of regulation of growth, meat and milk performance in farm and laboratory animals and humans, for breeding, as well as for the detection of reproductive disorders in veterinary and human medicine.

#### Acknowledgements

The authors thank Drs. L. Underwood and J. Van Wyk (University of North Carolina, Chapel Hill, USA) for the generous gift of rabbit anti-IGF-I antiserum, Ing. D. Mertin and Dr. J. Rafay (Department of Fur Animals, Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovakia) for the providing the nutria blood plasma and rabbit serum, Dr. A. Gladysz (Kielanowski Institute of Animal Physiology and Nutrition, Jablonna, Poland) for the supply of sheep blood plasma, Mrs. T. Civanova, Ms. Kubekova and Mrs. K. Tothova for technical assistance, as well as Prof. J. Bulla for invaluable support of this work.

#### REFERENCES

Bang P., Baxter R. C., Blum W. F., Breier B. H., Clemmons D. R., Hall K., Hintz R. L., Holly J. M. P., Rosenfeld R. G., Zapf J. (1994): Valid measurements of total IGF-I concentrations in biological fluids. Recommendations from the 3rd Int. Symp. on Insulin-like Growth Factors. *J. Endocrinol.*, **143**, C1-C2.

Basiouni G. F., Khalid M., Haresign, W. (1994): GnRH reduces the concentrations of immunoreactive IGF-I in ovine follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.*, **Abstr.**, **14**, 20.

Blum W. F., Breier B., Gluckman P., Ranke M. B. (1992): A novel IGFBP blocked IGF-I RIA that measures what it pretends to measure: IGF-I. *Acta Endocrinol.*, **126** (Suppl. 4), **Abstr.**, **107**.

Fotsis T., Murphy C., Gannon F. (1990): Nucleotide sequence of the bovine insulin-like growth factor I (IGF-I) and its IGF-I A precursor. *Nucl. Acids Res.*, **18**, 676.

Francis G. L., McNeil K. A., Wallace J. C., Ballard F. J., Owens P. C. (1989a): Sheep insulin-like growth factors I and II: Sequences, activities and assays. *Endocrinology*, **124**, 173-1183.

Francis G. L., Owens P. C., McNeil K. A., Wallace J. C., Ballard F. J. (1989b): Purification, amino acid sequences

and assay cross-reactivities of porcine insulin-like growth factor-I and -II. *J. Endocrinology*, **122**, 681-687.

Furlanetto R., Underwood, L., Van Wyk J., D'Ercole J. (1977): Estimation of somatomedin-C levels in normal and patients with pituitary disease by radioimmunoassay. *J. Clin. Invest.*, **60**, 648-657.

Giudice L. (1992): Insulin-like growth factor and ovarian follicular development. *Endocrin. Rev.*, **13**, 1304-1306.

Hammond J. M., Mondschein J. S., Samaras S. E., Smith S. A., Hagen D. R. (1991): The ovarian insulin-like growth factor system. *J. Reprod. Fertil.*, **43**, (Suppl.), 199-208.

Hammond J. M. (1981): Peptide regulators in the ovarian follicle. *Austral. J. Biol. Sci.*, **34**, 491-504.

Hernandez E. R., Resnick C. E., Svoboda M. E., Van Wyk, J. J., Payne D. W., Adashi E. Y. (1988): Somatomedin-C/insulin-like growth factor-I (Sm-C/IGF-I) as an enhancer of androgen biosynthesis by cultured rat ovarian cells. *Endocrinology*, **122**, 1603-1613.

Herrler A., Hegele-Hartung C., Breier H. M. (1992): Immunohistological detection of IGF-I in the rabbit oviduct and the uterus during the early pregnancy. *Acta Endocrinol.*, **126**, (Suppl. 4), 114.

Jansen M., Van Schaik F. M. A., Ricker A. T., Bullock B., Woods D. E., Gabbay K. H., Nussbaum A. L., Sussenbach J. S., Van Den Brande J. L. (1983): Sequence of cDNA encoding human insulin-like growth factor I precursor. *Nature*, **306**, 609-611.

Lee C., Mitchell K., Diehl A., Hendricks D. (1992): Secretion and expression of IGF-I in cultured porcine oviductal cells. *Biol. Reprod.*, **46**, (Suppl. 1), 113.

Makarevich A., Kochetkov A., Pivko J., Grafenau P., Kubovicova E., Oberfranc M. (1994): The effects of sex on the quality of Angora goat (*Capra hircus*) blood serum tested by a T3 cell culture. *Slov. Vet. Čas.*, **19**, 7-10.

Makarevich A., Sirotkin A. (1997): The involvement of GH/IGF-I axis in the regulation of secretory activity of bovine oviduct epithelial cells. *Anim. Reprod. Sci.*, **48**, 197-207.

Rinderknecht E., Humbel R. E. (1978): The amino acid sequence of human insulin-like growth factor-I and its structural homology with proinsulin. *J. Biol. Chem.*, **253**, 2769.

Schams D. (1994): Growth factors in milk. *Endocrin. Regul.*, **28**, 3-8.

Schmidt A., Einspanier R., Amselgruber W., Sinowatz F., Schams D. (1994): Expression of insulin-like growth factor I (IGF-I) in the bovine oviduct during the oestrous cycle. *Exp. Clin. Endocrin.*, **102**, 364-369.

Sirotkin A., Nitray J. (1994): Growth hormone and prolactin affect oxytocin, vasopressin, progesterone and cyclic nucleotide secretion by bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Endocrin.*, **143**, 417-422.

Sirotkin A., Schaeffer H. J. (1995): The effect of growth hormone on secretory activity of human granulosa cells *in vitro*. *Endocrin. Metab.*, **2**, 215-220.

Spicer L. J., Alpizar A., Echtenkamp S. E. (1993): Effects of insulin, insulin-like growth factor I, and gonadotropins on bovine granulosa cell proliferation, progesterone production, estradiol production, and (or) insulin-like growth factor I production *in vitro*. *J. Anim. Sci.*, **77**, 1232.

Spicer L. J., Echternkamp S. E., Canning S. F., Hammond J. M. (1988): Relationship between concentrations of immunoreactive insulin-like growth factor-I in follicular fluid and various biochemical markers of differentiation in bovine antral follicles. *Biol. Reprod.*, **39**, 573-580.

Wilson M., Miles L. (1977): Radioimmunoassay of insulin. In: Abraham G. E. (ed.): *Handbook of Radioimmunoas-*

*say*. New York and Basel, Marcel Dekker, Inc. Chpt. B, 275-297.

Wiseman D., Henricks D., Eberhardt D., Bridges W. (1992): Identification and content of insulin-like growth factors in porcine oviductal fluid. *Biol. Reprod.*, **47**, 126-132.

Received: 98-02-03

Accepted after corrections: 98-11-13

---

**Contact Address:**

MVDr. Alexander Makarevich, CSc, Výskumný ústav živočišnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovenská republika  
Tel. +421 87 51 52 40, fax +421 87 51 90 32, e-mail: makarev@vuzv.sk

---

## DETECTION OF HUMAN PROTEIN C GENE INTEGRATION IN TRANSGENIC RABBITS BY POLYMERASE CHAIN REACTION

## DETEKCIA INTEGRÁCIE GÉNU HUMÁNNEHO PROTEÍNU C U TRANSGÉNNYCH KRÁLIKOV METÓDOU POLYMERÁZOVEJ REŤAZOVEJ REAKCIE

P. Chrenek, D. Vašiček, A. Makarevich, T. Gajarská, I. Gastnerová, J. Bulla

*Research Institute of Animal Production, Nitra, Slovak Republic*

**ABSTRACT:** From a total of 200 rabbit pronuclear stage zygotes microinjected with WAP-hPC gene (mouse whey acid protein promoter – human protein C) were obtained 21 liveborn descendants after transfer to recipients. The integration of the WAP-hPC gene in the genome of born rabbits was determined in samples of DNA, isolated from tissue or blood by PCR method. The integration was confirmed in 2% (4/200), or in 19% (4/21) of F<sub>0</sub> rabbits, in 11% (5/46) of F<sub>1</sub> and in 31% (4/13) of F<sub>2</sub> generation using two primer sets.

rabbit zygotes; microinjection; WAP-hPC; integration; PCR

**ABSTRAKT:** Z celkového počtu 200 zygot v štádiu prvoadjard, mikroinjektovaných génom WAP-hPC (promótor myšieho kyslého srvátkového proteínu – ľudský proteín C), bolo po prenose do recipientiek získaných 21 živonarodených jedincov. Integrácia WAP-hPC génu v génome narodených králikov bola zisťovaná pomocou PCR metódy, kde DNA bola izolovaná z tkaniva alebo z krvi. Integrácia bola potvrdená u 2 % (4/200), resp. u 19 % (4/21) králikov z F<sub>0</sub>, u 11 % (5/46) v prípade F<sub>1</sub> a u 31 % (4/13) v prípade F<sub>2</sub> generácie.

králičie zygoty; mikroinjekcia; WAP-hPC; integrácia; PCR

### INTRODUCTION

Human protein C (hPC) is a vitamine K-dependent glycoprotein, present in plasma, which is normally synthesized in the liver and takes part in the process of blood clotting (Lubon et al., 1996). Human protein C consists of a heavy chain (Mr 41000) and light chain (Mr 21000) linked by a disulfide bond (Kisiel, 1979). The deficiency of hPC is inherited as an autosomal dominant disease and it is associated with thromboembolic complications. The replacement therapy using a concentrate of human protein C was shown to be more effective in protecting patients. However, because of the short half-life of hPC (6 hours), frequent infusions are required. Therefore the interest in the development of an alternative means for the production of hPC has been arising. One of such ways could be realized through the transgenic animals.

A number of factors can limit the efficiency of production of transgenic animals. The greatest limiting factor is a low rate of incorporation of transgenes into

the genome of microinjected embryos. The mechanism by which injected DNA integrates into a chromosome is unknown. Injected DNA usually integrates in a single site on a chromosome but multiple integration can occur as well (Wilmot et al., 1991). The DNA integration frequency is also affected by improper injection, dilution of DNA, insufficient purity of DNA, etc. (Mann and McMahon, 1993).

The aim of the present work was to create rabbits with the integration of hPC gene. We detected hPC gene integration in various generations of rabbits born after transfer of microinjected embryos to recipients. Two pairs of primers were used for detection by PCR method.

### Zygote collection

Zygotes in the pronuclear stage were flushed from the oviduct of the hormonally treated and slaughtered New Zealand White and California rabbits by Dul-

becco's PBS (Sigma, St. Louis, USA) supplemented with 10% FCS (University of Veterinary Medicine, Brno, Czech Republic). The zygotes were fixed with holding pipette by suction, and gene construct was injected by air pressure. After microinjection, the zygotes were cultured at 39 °C in culture medium (DME/F12 with 1.5% BSA and growth factors: EGF 10 ng/ml, insulin 5 µg/ml, transferrin 5 µg/ml and sodium selenite 5 µg/ml, all purchased from Sigma) during 2–6 hours and transferred into the oviduct of recipients under general anesthesia.

#### Gene construct for microinjection

The construct used for microinjection was 13.4 kb linear DNA fragment consisting of genomic human protein C (hPC) under control of the murine whey acidic protein (WAP) promoter. This construct was designed by Dr. Henryk Lubon (Holland Laboratory, American Red Cross, USA). The construct was cloned, purified and diluted in buffer (10 mM Tris-HCl, 0.2 mM EDTA, pH 7.5) to give a final concentration of 5 µg/ml (345 copies/pl). DNA solution at 1–2 pl was injected into the pronuclei of zygotes.

#### Analysis of hPC gene integration

Total DNA was isolated from the tissue or blood of born rabbits by lysis (lysis solution and proteinase K 100 µg/ml, Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) and phenol/chloroform extraction (Sambrook et al., 1989). Integration events of hPC gene in samples were detected by PCR using hPC primers 5' – CAG CAC AGC CTC CCC TAC TCA AA – 3' and 5' – CTC CGC CCC CTC AAG ACT CAT TC – 3' (Chrenek et al., 1997), where the PCR product was amplified in 35 cycles under the following conditions: denaturation at 94 °C for 1 min, annealing at 68 °C for 1 min and extension at 72 °C for 1 min. The integration of this gene was confirmed using other HPC primers 5' – CAG TCA CTT GCC TGA CAC CGG TAC – 3' and 5' – GCC AGT GTG CAT TTG AGT AGG GGA – 3' (Drohan et al., 1994). PCR product was amplified under the same temperature conditions, besides temperature of annealing (58 °C). PCR products were identified and evaluated by comparing with positive and two negative controls on 1.5% agarose gel (Serva, Heidelberg, Germany) stained with EtBr.

#### Preliminary analysis of hPC gene expression in milk

Milk letdown was induced by intramuscular administration of 4 IU of oxytocin on the tenth day of lactation. Milk was sampled directly into coagulation buffer (100 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl, pH 6.5) at a 1 : 1 buffer to milk ratio. Fat and precipitate were

#### I. Results of the integration of hPC gene in genomes transgenic rabbits

Generation	No. of born descendants	No. of rabbits with integration	No. of living rabbits
F <sub>0</sub>	21	4/21 (19%)	4/21 (19%)
F <sub>1</sub>	46	5/46 (11%)	2/46 (4.3%)
F <sub>2</sub>	13	4/13 (31%)	1/13 (7.7%)

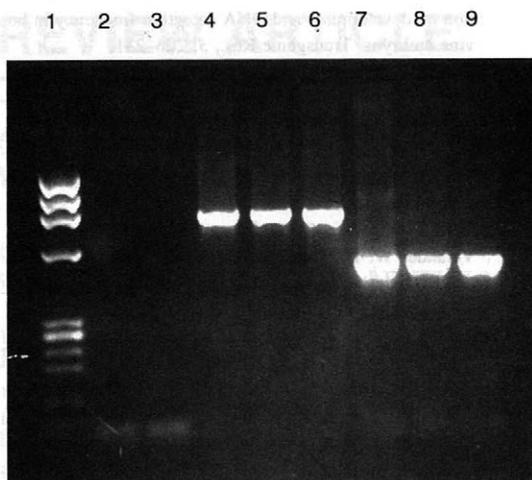
removed by centrifugation (12 000 g) and samples were stored at –196 °C until SDS-PAGE. Immediately before PAGE procedure the samples of rabbit milk from founders were mixed in electrophoresis buffer without β-mercaptoethanol and electrophoresed using SDS-PAGE (10% resolving gel) in non-reducing conditions.

A total of 200 zygotes in pronuclear stage were microinjected and transferred to the infundibulum part of oviduct of hormonally stimulated recipients. We transferred about 16 embryos per recipient, of which 45% became pregnant and delivered a total of 21 descendants. The integration of the hPC gene construct in the genome of born rabbits was determined by PCR method. The resulting size of the PCR product of hPC by first set primers (Chrenek et al., 1997) was 811 bp. The integration of hPC gene in rabbit genomes was confirmed by amplification of the PCR product at size of 501 bp using second set primers (Drohan et al., 1994). Representative results of the PCR assay are shown in Fig. 1.

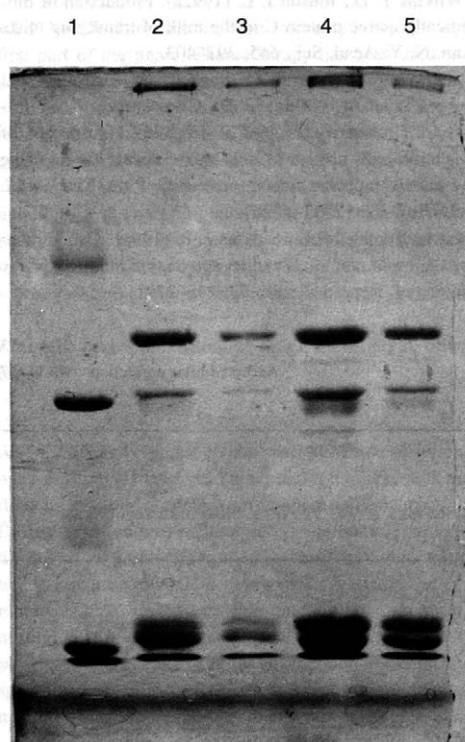
The integration events were confirmed only in 4 (19%) rabbits (3 females and 1 male) using two primer sets (Tab. I). The rabbits with gene integration (F<sub>0</sub> generation) were used for breeding with normal rabbits.

The samples of rabbit milk from founders were electrophoresed using SDS-PAGE (10% resolving gel) in non-reducing conditions. The protein bands at size 62 kDa (Fig. 2, lines 2, 4, and 5) corresponding to the complex of both chains of human protein C were found in three females with no specific bands observed in negative control, submitting a preliminary evidence for hPC production in milk of transgenic rabbits.

The data demonstrating different efficacy of gene integration depending on gene construct and animal species are reported. Burdon and Wall (1992) using the PCR detected microinjected DNA (WAP gene) in 17% of transgenic mice. Page et al. (1995) the using same method found 22% integration of WAP-hPC gene in transgenic mice. The integration of hPC gene and its expression were also confirmed in mice by Velander et al. (1992a) and Drohan et al. (1994), in pigs (Velandar et al., 1992b) and in bovine zygotes (Krisner et al., 1994). The integration frequency for other gene constructs was reported as 12.8% in rabbit, 1.3% in sheep and 10.4% in swine ova (Hammer et al., 1985). The percentage of gene-injected embryos that developed into transgenic animals varied from 0.31 to 4.03% in pigs, 0.1 to 4.45% in sheep, 1.0 to 1.7% in goats, and



1. Representative results of the PCR. Samples are distributed as follows: line 1 – molecular marker PhiX174/HaeIII, line 2, 3 – negative controls, line 4 – positive control for the first primer set (811 bp), line 5, 6 – DNA rabbit samples, line 7 – positive control for the second primer set (501 bp), line 8, 9 – DNA rabbit samples



2. Results of the SDS-PAGE. Samples are distributed as follows: line 1 – molecular weight marker, line 2 – female no. 1, line 3 – negative control, line 4 – female no. 2, line 5 – female no. 3

0.34 to 2.63% in cattle (Pursel, 1995). Lower percentage of gene integration 2% (4/200) from all micro-injected zygotes in our study in comparison with another report in rabbits (12.8%) may be explained by the reason that injected DNA is not always destined directly to the pronucleus but to the cytoplasm.

The results of PCR assay confirm only the presence of injected DNA in the cell, regardless of integration status. It is known, that in mice and in livestock ani-

mals the expression of non-milk proteins in the mammary gland, using regulatory elements of milk protein genes was demonstrated (Houdebine, 1993). Although we detected integration also in F<sub>1</sub> and F<sub>2</sub> generation, it is not still quite clear whether the gene is active or not. In our SDS-PAGE study we submit a preliminary evidence for the secretion of hPC in rabbit milk. The analysis by ELISA test and Western blot for direct confirmation of hPC secretion is now our actual task.

## Acknowledgement

The authors thank to Dr. Henryk Lubon (Holland Laboratory American Red Cross, USA) for providing of WAP-hPC gene construct.

## REFERENCES

- Burdon T. G., Wall R. J. (1992): Fate of microinjected genes in preimplantation mouse embryos. *Mol. Reprod. Develop.*, **33**, 436–442.
- Chrenek P., Makarevich A., Vašíček D., Bauerová M., Rafaj J., Bulla J. (1997): Influence of microinjection on development of potential rabbit embryos *in vitro*. *Biotechnologija u stočarstvu*, 407–410.
- Drohan W. N., Zhang D. W., Paleyanda R., Chang R., Wroble M., Velander W. H., Lubon H. (1994): Inefficient processing of human protein C in the mouse mammary gland. *Transgenic Res.*, **3**, 355–364.
- Hammer R. E., Pursel V. G., Rexroad C. E., Wall R. J., Bolt D. J., Ebert K. M., Palmiter R. D., Brinster R. L. (1985): Production of transgenic rabbits, sheep and pigs by microinjection. *Nature*, **315**, 680–683.
- Houdebine L. M. (1993): Expression de protéines recombinantes dans le lait d'animaux transgéniques. *Rev. Fr. Transfus. Hemobiol.*, **36**, 49–72.
- Kisiel W. (1979): Human plasma protein C. Isolation, characterization and mechanism of activation by trombin. *J. Clin. Invest.*, **64**, 761–769.
- Krisner R. L., Gibbons J. R., Canseco R. S., Johnson J. L., Russell C. H. G., Noter D. R., Velander W. H., Gwazdauskas F. C. (1994): Influences of time of gene microinjection on development and DNA detection frequency in bovine embryos. *Transgenic Res.*, **3**, 226–231.
- Lubon H., Paleyanda R. K., Velander W. H., Drohan W. N. (1996): Blood proteins from Transgenic Animal Bioreactors. *Transfus. Med. Rev.*, **2**, 131–143.
- Mann J. R., McMahon A. P. (1993): Factors influencing frequency production of transgenic mice. *Meth. Enzymol.*, **225**, 771–781.
- Page R. L., Canseco R. S., Russell C. G., Johnson J. L., Velander W. H., Gwazdauskas F. C. (1995): Transgene detection during early murine embryonic development after pronuclear microinjection. *Transgenic Res.*, **4**, 12–17.
- Pursel V. G. (1995): Progress in genetic modifications of farm animals. *Amer. Chem. Soc.*, 210–229.
- Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. (1989): *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York, Cold Spring Harbor Lab. 1626 pp.
- Velander W. H., Page R. L., Morcol T., Russell C. G., Canseco R., Young J. M., Drohan W. N., Gwazdauskas F. C., Wilkins T. D., Jonson J. L. (1992a): Production of biologically active protein C in the milk of transgenic mice. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **665**, 391–403.
- Velander W. H., Jonson J. L., Page R. L., Russell C. G., Subramanian A., Wilkins T. D., Gwazdauskas F. C., Pit-tius C., Drohan W. N. (1992b): High-level expression of a heterologous protein in milk of transgenic swine using the cDNA encoding human protein C. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 12003–12007.
- Wilmut I., Hooper M. L., Simons J. P. (1991): Genetic manipulation of mammals and its application in reproductive biology. *J. Reprod. Fertil.*, **92**, 245–279.

Received: 97-11-13

Accepted after corrections: 98-11-27

---

## Contact Address:

Ing. Peter Chrenek, PhD., Výskumný ústav živočišnej výroby, Hlohovská 2, 949 92 Nitra, Slovenská republika  
Tel. +421 87 54 62 36, fax +421 87 54 63 61, e-mail: chrenekp@vuzv.sk

---

## ALTERNATIVES FOR NEMATODE CONTROL IN CONNECTION WITH ANTHELMINTIC RESISTANCE

## ALTERNATÍVY PRE TLMIENIE NEMATODÓZ V SÚVISLOSTI S REZISTENCIOU VOČI ANTIHELMINTIKÁM

J. Praslička<sup>1</sup>, V. Letková<sup>2</sup>, D. Lukešová<sup>3</sup>*<sup>1</sup>Research Institute of Experimental Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic**<sup>2</sup>University of Veterinary Medicine, Košice, Slovak Republic**<sup>3</sup>University of Veterinary and Pharmaceutical Sciences, Brno, Czech Republic*

**ABSTRACT:** Short introduction to chemotherapy as well as a list of the most frequently used anthelmintics are given in the first part of the paper. Chemotherapy has been used as the only means of parasite control in many cases, which results in development of resistance of some nematode parasites to anthelmintic drugs. Furthermore, there is a considerable problem of residues both in animal tissues and on pasture. Options for other chemotherapeutical approaches, in case that anthelmintic resistance occurs, are discussed (using another drug, combinations of drugs, possibilities of reversion to susceptibility, prospects for development of new drugs). The main goal of the paper is to introduce non-chemotherapeutical methods for helminth control – vaccines against helminths, genetic approaches (selection for helminth-resistant hosts and genetic manipulations of the parasite), alternative chemicals (growth regulators), biological control (nematophagous fungi). However, the most of these methods are in the stage of intensive research and it probably takes some time before they become a part of reliable helminth control systems. Therefore, there are a few short recommendations presented how to maintain the sufficient efficacy of anthelmintics and to prevent or delay the development of anthelmintic resistance.

nematode control; anthelmintic drugs; anthelmintic resistance; vaccines; genetic selection; growth regulators; nematophagous fungi

**ABSTRAKT:** Prvá časť článku patrí krátkemu historickému prehľadu antihelmintických chemoterapeutík a sú tu uvedené aj najčastejšie používané antihelmintiká a ich liekové formy. Chemoterapia je v mnohých prípadoch dlhodobo jedinou metódou tlmienia helmintóz, dôsledkom čoho sa u niektorých parazitických nematódov vyvinula rezistencia voči antihelmintikám. Ďalším negatívom sú reziduá liečiv, a to tak v živočíšnych produktoch, ako aj na pasienku. Rozoberajú sa iné chemoterapeutické možnosti pre prípady, že sa rezistencia voči antihelmintikám v chove vyskytuje (použitie iného liečiva, kombinácie liečiv, možnosť reverzie k vnímavosti, vyhliadky na vývoj nového liečiva). Hlavným cieľom článku bolo predstaviť nechemoterapeutické metódy tlmienia helmintóz – vakcíny proti helmintom, genetické prístupy (selekcia helminto-rezistentných hostiteľov a genetické manipulácie s parazitom), alternatívne látky (regulátory rastu), biologická kontrola (nematodofágne plesne – fungi). Tieto metódy sú väčšinou v štádiu intenzívneho výskumu a zrejme ešte nejaký čas potrvá, kým sa stanú spoľahlivou súčasťou komplexných protiparazitárnych systémov. Preto sa uvádzajú aj stručné odporúčenia, ako dlhodobo udržať dostatočnú účinnosť antihelmintík a tak predísť alebo aspoň oddialiť nástup rezistencie.

tlmienie nematodóz; antihelmintiká; rezistencia voči antihelmintikám; vakcíny; genetická selekcia; regulátory rastu; nematodofágne plesne (fungi)

**CONTENTS**

1. Introduction
2. Other chemotherapeutic possibilities
  - 2.1. Application of another wide-spectrum anthelmintic
  - 2.2. Application of narrow-spectrum anthelmintic
  - 2.3. Anthelmintic combinations

**OBSAH**

1. Úvod
2. Iné chemoterapeutické možnosti
  - 2.1. Použitie iného širokospektrálneho antihelmintika
  - 2.2. Použitie úzkospektrálneho antihelmintika
  - 2.3. Kombinácie antihelmintík

- 2.4. Possibility of reversion to sensitivity
3. New anthelmintics
4. Vaccines against helminths
5. Genetic approaches
  - 5.1. Selection of resistant hosts
  - 5.2. Genetic manipulations with parasite
6. Alternative substances
7. Biological control nematophagous fungi
8. Conclusion
9. References

## 1. ÚVOD

Metódy, ktoré sa v súčasnosti používajú pri tmení helmintóz hospodárskych zvierat, spočívajú prevažne v chemoterapii. Najstaršími antihelmintikami boli farmaká rastlinného pôvodu, ktoré sú dnes už obsoletné. Éra syntetických látok, chemoterapeutík, sa pri liečení helmintóz začala v 20. rokoch nášho storočia, keď sa ako antinematodiká a antitrematodiká začali používať chlórované uhľovodíky. Postupne sa potom zavádzali na trh nové látky: v 40. rokoch fenotiazín, v 50. rokoch organofosfáty, v 60. rokoch tiabendazol, pyrantel a tetramizol, v 70. rokoch morantel, levamisol a nové benzimidazoly a v 80. rokoch avermektíny (Campbell, 1986).

Trh dnes ponúka dostatok prípravkov v rôznych cenových reláciách a s rozličnou šírkou spektra účinnosti. Najpoužívanejšie sú širokospektrálne antihelmintiká, delené podľa chemickej štruktúry a mechanizmu účinku do troch skupín:

- benzimidazoly: u nás napríklad albendazol (prípravky ALDIFAL, Mevak; VALBAZEN, SmithKline Beecham; VERMITAN, Sanofi), fenbendazol (FENBION, Mevak; PANACUR, Hoechst), mebendazol (MEBENVET, Gedeon Richter; TELMIN, Janssen) a iné;
- imidotiazoly a tetrahydropyrimidíny: levamisol (NILVERM, Bioveta; REVLIN, Mevak), morantel (PARATEC, Pfizer);
- avermektíny a milbemycíny: ivermektín (IVOMEK, MSD AgVet), doramektín (DECTOMAX, Pfizer), moxidektín (CYDECTIN, Fort Dodge).

Poslednú skupinu tvoria avermektíny a milbemycíny, ktoré sú popri svojom širokospektrálnom účinku na endoparazity účinné aj na ektoparazity. Aplikácia a dávkovanie antihelmintík nie sú komplikované, najbežnejšie sú do krmíva, injekcia, prípadne *per os* (roztoky, suspenzie) a v poslednom období sú to tiež pasty a gély, napríklad ivermektín pre kone (EQVALAN pasta; Merial) alebo fenbendazol pre mladý dobytok (PANACUR pasta; Hoechst). Zaujímavým riešením boli intraruminálne kapsuly s protahovaným účinkom (postupným uvoľňovaním liečiva), napríklad albendazolový PROFTRIL-CAPTEC (SmithKline Beecham). Poslednou snahou farmaceutických firiem je poskytnúť liekovú formu *pour on* a *spot on*. Účinná látka je v tekutom nosiči a aplikuje sa na kožu zvierata pozdĺž chrbtice (*pour on*) alebo na jedno miesto medzi lopatkami (*spot*

- 2.4. Možnosť reverzie k citlivosti
3. Nové antihelmintiká
4. Vakcíny proti helmintom
5. Genetické prístupy
  - 5.1. Selekcija odolných hostiteľov
  - 5.2. Genetické manipulácie s parazitom
6. Alternatívne látky
7. Biologická kontrola – nematodofágne plesne (fungi)
8. Záver
9. Literatúra

*on*). Výhody aplikácie *pour on* sa uplatnili aj pri avermektínových a milbemycínových antiparazitikách ivermektín a moxidektín (Čorba, 1994) a tiež novom eprinomektíne (IVOMEK EPRINEX; Merial).

Chemoterapia teda skutočne predstavuje vcelku jednoduchý a pohodlný spôsob, ako sa vysporiadať s parazitárnou infekciou v chove. Z dlhodobého hľadiska nie je však rozumné spoliehať sa na tento jediný, i keď stále vysoko účinný spôsob liečenia či prevencie helmintóz. Po tom, ako sa objavili prvé správy o zlyhaní chemoterapie, začal sa v 70. rokoch intenzívny výskum rezistencie parazitických nematódov voči antihelmintikám, ktorá bola potvrdená aj u nás (Várady a i., 1993; Praslička a i., 1994a, 1995; Várady a Čorba, 1997). Terapia pri takýchto infekciách potom nie je jednoduchá, ak je vôbec možná (Čorba a i., 1993; Várady a i., 1994; Praslička a i., 1994b). Rezistencia je následkom najmä nesprávneho dávkovania antihelmintík (poddávkovanie, časté podávanie, neobmieňanie podávaných liečiv). Rezistentné nematódy sa môžu do chovu dostať aj priamou introdukciou nákupom alebo presunmi nakazených zvierat z iných chovov (Praslička, 1994a, 1995a).

Antihelmintiká majú ešte jedno nezanedbateľné negatívum – rezíduá. Rezíduá liečiv a ich metabolitov sú nachádzané vo vnútorných orgánoch, svalstve, živočíšnych produktoch a tiež v exkrementoch, ktoré sa dostávajú na pasienok a môžu mať negatívny vplyv na pôdnu mikroflóru.

Preto sa do popredia vedeckého, ale už aj praktického záujmu dostávajú popri chemoterapii a cieleňých pasienkových systémoch iné, alternatívne metódy tmenia parazitóz. Je to vakcinácia, šľachtenie plemien odolných voči helmintom, podpora rastlín s antihelmintickým účinkom na pasienku, či biologická kontrola. Niektoré z týchto alternatívnych metód budú predstavené v nasledujúcich kapitolách.

## 2. INÉ CHEMOTERAPEUTICKÉ MOŽNOSTI

### 2.1. Použitie iného širokospektrálneho antihelmintika

Pri rezistencii voči určitému typu antihelmintika môže byť efektívne použitie liečiva z inej chemickej skupiny, s iným mechanizmom účinku. Po istom čase výlučného používania tohto druhého liečiva sa však môže rezistencia vyvinúť aj voči nemu, čo vedie ku vzniku polyrezistencie (McKenna, 1990).

## 2.2. Použitie úzkospektrálneho antihelmintika

Ak ide o kmene rezistentné voči všetkým trom skupinám širokospektrálnych antihelmintík (benzimidazol, levamizol a avermektín), je možné použiť liečivá s užším spektrom účinnosti (Coles a Roush, 1992). Napríklad klosantel a niektoré iné nitrofenyly a salicylanilidy sú efektívne proti *Haemonchus contortus* (Hall a i., 1981).

## 2.3. Kombinácie antihelmintík

Zdá sa, že súčasné podanie dvoch účinných zložiek s rôznym mechanizmom účinku má lepší efekt, než ich striedavé používanie. Kombinácie liečiv sú výhodné v tom, že jedna zložka pôsobí aj na tie jedince parazitov, ktoré môžu byť odolné voči druhej zložke, alebo sú heterozygotmi nesúcimi recesívny gén pre rezistenciu. Avšak aj tu existuje riziko, že po istom čase sa vyvinie rezistencia tiež proti účinnej zložke kombinácie. Použitie kombinácie liečiv je proti rezistentným helmintom najúčinnnejšie vtedy, ak účinnosť každého liečiva v kombinácii je vysoká (Prichard, 1990).

## 2.4. Možnosť reverzie k citlivosti

V súvislosti s výskytom rezistentných nematódov sa často diskutuje o možnosti reverzie, t.j. obnovenia vnímavosti k antihelmintiku. Na jednej strane sa napríklad Martin (1990) zamýšľa nad možnosťou vmiešania vnímavých jedincov do rezistentnej populácie parazitov a poukazuje na istý úspech, ktorý v tejto oblasti dosiahli Van Wyk a Schalkwyk (1990). Reverziu benzimidazol-rezistentných kmeňov po prechodnom používaní iných látok, najmä levamizolu, potvrdili aj ďalší autori (Kelly a Hall, 1979; Donald a i., 1980; Waller a i., 1983). Výrazná reverzia by mala praktický význam, pretože by vznikla možnosť obnoveného používania antihelmintika.

Na druhej strane však práce na príklade benzimidazolov dokumentujú, že ak raz preukázateľná forma rezistencie vznikne, už „neodíde“ (Borgsteede a Duyn, 1989). Citlivosť benzimidazol-rezistentného kmeňa *Haemonchus contortus* k benzimidazolom u oviec sa neobnovila ani po šesťročnom výlučnom podávaní levamizolu. Pokusy o preukázanie reverzie zlyhali aj v ďalších prípadoch (Hall a i., 1982; Herd a i., 1984; Maingi a i., 1990).

Tieto kontroverzné výsledky možno pripísať na vrub individuálnym rozdielom medzi populáciami. Súčasné poznatky však naznačujú, že rezistencia voči benzimidazolom sa po opätovnom zavedení benzimidazolov znovu rýchlo vyvinie (Coles a Roush, 1992).

## 3. NOVÉ ANTIHELMINTIKÁ

Otázka vývoja nových účinných antihelmintík je problematická a pri dnešnej nasýtenosti trhu a extrémne vysokých ekonomických nárokov aj riskantná. Vý-

voj nového liečiva trvá 6 až 10 rokov a celkové náklady môžu dosahovať až 100 miliónov USD (Waller, osobné zdedenie). Nádejnými sa zdali liekové formy, ktoré zabezpečujú protrahovaný kontakt liečiva s parazitom a predlžujú tak dobu jeho pôsobenia. Tieto intraruminálne alebo subkutánne formy ostávajú v tele hostiteľa dlhší čas a majú perzistentný účinok. Avšak, stále sú to len iné liekové formy už existujúcich antihelmintík a s prihliadnutím na fenomén polyrezistencie, ako aj skríženej rezistencie v rámci tej istej chemickej skupiny liečiv, sa ani od nich nedá očakávať veľký prínos (Waller, 1987).

## 4. VAKCÍNY PROTI HELMINTOM

Vývoj vakcín proti helmintom hospodárskych zvierat sa ukázal byť obzvlášť zložitým problémom. Od vakcín sa očakáva, že budú vhodnou alternatívou, prípadne doplnkom chemoterapie nielen z cenového hľadiska, ale aj z hľadiska účinnosti. Vakcinácia má v porovnaní s podávaním antihelmintík aj ďalšie výhody – žiadne reziduá. Sú viac špecifické a riziko nástupu rezistencie je minimálne.

Pri ektoparazitoch sa zatiaľ úspešne používa jediná vakcína, a to proti kliešťom hovädzieho dobytku *Boophilus microplus* v Austrálii (Willadsen, 1997). S vakcináciou proti helmintom sa už dosiahli určité úspechy. Je to najmä rádiáciu atenuovaná larválna vakcína proti pľúcny červom *Dictyocaulus viviparus* u hovädzieho dobytku (Jarrett a i., 1955; Peacock a Poynter, 1980; Procházka a Tománek, 1968; Tománek, 1971), ktorá sa používa už tri desaťročia a v menšom rozsahu aj vakcína proti *D. filaria* u oviec alebo kôz (Sharma, 1994). S veľkým očakávaním sa preto pristupovalo k vývoju vakcín proti ďalším pôvodcom závažných, najmä gastrointestinálnych helmintóz podobnými atenuačnými procedúrami a v poslednom období aj pomocou molekulárnych postupov pri použití antigénových frakcií z tkanív cudzopasníkov. V sľubnom štádiu vývoja je v súčasnosti vakcína proti *Haemonchus contortus*, závažnému endoparazitovi oviec. Nedospeľo sa však zatiaľ k výsledkom, ktoré by mohli byť základom pre nový komerčný produkt (Waller, 1997). Pretrvávajú problémy vyplývajúce z komplexnosti imunitnej odpovede, identifikácie protektívnych protilátok a zložitých helminto-hostiteľských vzťahov a pomalého nástupu imunity. Parazity sú schopné modulovať alebo potlačiť imunitný systém hostiteľa a prekonať taktiež vplyv výživy, hormonálneho stavu a veku hostiteľa (Dineen, 1985). Práve imunitná odpoveď u mladých zvierat, ktoré najviac potrebujú ochranu, je slabšia a na rozdiel od vírusových či bakteriálnych infekcií získaná imunita nie je dostatočne stála (Waller, 1987).

Situácia však nie je taká nepriaznivá. Prudký rast poznatkov v imunológii, molekulárnej genetike a v príslušných technológiách dáva nádej, že vývoj molekulárnej vakcín proti nematódom zvierat bude nepochybne úspešný (Smith a Munn, 1991). Nedávne pokroky

v izolácii a klonovaní umožňujú výrobu značného množstva purifikovaných protektívnych antigénov proti jednotlivým druhom nematódov (Emery a Wagland, 1991).

Prísľubom sú tiež vakcíny proti hematofágny m artopódom, ktorí pôsobia ako vektori niektorých parazitárnych infekcií (Fuhrman a i., 1992; Shahabuddin a i., 1996).

Ako výzva pre ďalší výskum teraz ostáva objaviť medzidruhové imunogény a vyvinúť transportné systémy, ktoré budú optimalizovať prísun antigénov do imunitného systému hostiteľa (Murray, 1989).

## 5. GENETICKÉ PRÍSTUPY

### 5.1. Selekcia odolných hostiteľov

Reakcie na vakcináciu proti parazitárnym infekciám u prirodzených plemien zvierat nie sú vždy rovnaké. Zistenie, že tieto rozdiely sú pravdepodobne geneticky kódované, viedlo k zvýšenému záujmu o možnosť praktického využitia tohto fenoménu pomocou genetického výberu zvierat, ktoré sú dedične odolné voči parazitom (Dineen, 1985). Najlepším príkladom sú plemená zvierat žijúce v regiónoch, kde sú vystavené extrémne vysokým koncentráciám invázných štádií parazitov a v procese prirodzenej selekcie nadobudli odolnosť voči parazitom, napríklad helminto- a trypano-tolerantný N'Dama dobytok v západnej Afrike, helminto-rezistentný červený masaický dobytok vo východnej Afrike alebo ovce plemien St. Croix a Barbados Belly v karibskej oblasti. Sú známe aj lokálne africké plemená oviec odolné voči haemonchóze (Schillhorn van Veen, 1997).

Avšak okrem tejto vítanej vlastnosti sú takéto plemená zvyčajne chovateľsky nevýhodné – pomaly dospievajú a majú menší telesný rámec (Waller, 1993). Pri úžitkových plemenách by sa snáď dali pomocou genetických manipulácií vyšľachtiť kmene zvierat, ktoré by boli rezistentné voči nematódom. Dedičnosť rezistencie je vysoká a dobré výsledky sa môžu dosiahnuť nielen proti jednému druhu parazitov, ale aj proti ich širšej škále, ktorá sa bežne vyskytuje v teréne (Dineen, 1985). Doterajšie štúdie potvrdzujú dedičnosť odolnosti voči parazitom (Dineen a Wagland, 1982), avšak proces genetickej selekcie odolných zvierat je vzhľadom na dlhý generačný interval značne pomalý. Nádej na urýchlenie dávajú metódy embryomanipulácie, ktoré môžu uľahčiť disemináciu želaného genofondu v populácii hostiteľských zvierat (Waller, 1987).

### 5.2. Genetické manipulácie s parazitom

Le Jambre (1984) sa pokúšal znížiť patogenitu *Haemonchus contortus* u oviec jeho hybridizáciou s boviným druhom *H. placei*. V laboratórnych podmienkach

sa to podarilo a naviac nový hybrid bránil ďalšej infekcii *H. contortus*. Žiaľ, tieto postupy sa v praxi nepotvrdili.

## 6. ALTERNATÍVNE LÁTKY

Sem patria látky, ktoré nie sú konvenčnými antihelmintikami a ktoré prerušujú životný cyklus parazita počas endogénnej alebo exogénnej fázy. Tieto látky sú všeobecne pomenované ako regulátory rastu nematódov a zahŕňajú rôzne hormóny, ich analógy aj ich antagonistov, inhibítory rastu a feromóny (Waller a Lacey, 1985). Doposiaľ najslubnejšou látkou sa zdá byť triflumoron, regulátor rastu hmyzu (Waller a Lacey, 1986). Táto látka má silné účinky proti voľne žijúcim larvám *Trichostrongylus colubriformis*, avšak jej účinky nie sú až tak presvedčivé pri iných, blízko príbuzných nematódoch.

## 7. BIOLOGICKÁ KONTROLA – NEMATODOFÁGNE PLESNE (FUNGI)

Podobne ako regulátory rastu, aj metódy biologickej kontroly sa sústreďujú na voľne žijúce štádiá na pasienku – vajíčka, aktívne rastúce štádiá (larvy L1 a L2) a invázne štádiá. Ako prostriedky biologickej kontroly prichádzajú do úvahy rôzne baktérie, vírusy a protozoa.

Najslubnejšou skupinou sú nematodofágne plesne, ktoré sa bežne vyskytujú v rastlinných zvyškoch, odstátych fekáliách a v pôde. V posledných rokoch sa na ne sústreďuje pozornosť v súvislosti s ich využitím ako biologického nepriateľa parazitických nematódov zvierat.

Cieľom je, aby plesne prešli neporušene cez gastrointestinálny trakt hostiteľa a boli schopné ďalej rásť vo *faeces* po vylúčení do vonkajšieho prostredia (na pasienku) a likvidovať tam prítomné štádiá parazita. Podľa spôsobu a charakteristiky nematodofágnej aktivity (spôsob chytenia a deštrukcie parazita) sú tieto plesne rozdelené do troch skupín (Barron, 1977; Nordbring-Hertz, 1988):

- dravé plesne (predátory): vytvárajú špecifické štruktúry, sieťovité alebo sľučkovité pasce, do ktorých sa parazit zamotá;
  - endoparazitické (endozoické) plesne: invadujú do parazita lepkavými spórmi, ktoré adherujú na kutikulu, alebo prenikajú do telovej dutiny parazita;
  - plesne parazitujúce na vajíčkach nematódov: majú schopnosť atakovať parazita v jeho štádiu vajíčka.
- Nematofágna aktivita sa zistila u niekoľko sto druhov plesní, z ktorých najlepšie výsledky naznačujú zástupcovia rodov *Arthrobotrys* a *Duddingtonia* (Larsen a i., 1991). Plesne po aplikácii prežúvavcom (ako najlepšia sa zatiaľ javí forma prídavku do krmiva) a následnej pasáži cez ich tráviacu sústavu dokážu zredukovať počty voľne žijúcich štádií nematódov až o 75 % (Gronvold a i., 1985).

Aj v tejto oblasti je ešte viacero nedokončených úloh. Je potrebné identifikovať najvhodnejšie druhy plesní, ktoré dokážu prežiť pasáž tráviacim traktom hostiteľa a rásť vo *faeces* a overiť ich druhovú špecifickosť (vo vzťahu k parazitovi i k hostiteľovi), ktoré budú účinné proti parazitom, ale neškodné pre hostiteľský organizmus a mikroflóru a mikrofaunu na pasienku. Taktisto ešte nie je presne vyriešená frekvencia, dávkovanie a spôsob aplikácie, ako aj ich komerčná príprava (Larsen, 1991 – nepublikované).

Biologickí nepriatelia len zriedka úplne eliminujú cieľové organizmy, sú však schopní redukovať ich počty na prijateľnú mieru. Nebudú teda úplnou náhradou za chemoterapiu, ale môžu sa úspešne zaradiť do komplexu opatrení na účinné zvládnutie helmintóz zvierat (Waller a Larsen, 1993). Pri podaní v správnom čase, keď počasie vyhovuje rastu plesní, sa dá predpokladať, že množstvá lariev budú permanentne redukované. Za takéhoto ideálneho stavu by sa dalo predchádzať klinickým formám helmintóz a strátať na úžitkovosti, ale súčasne by sa zachoval dostatok lariev na to, aby stimuloval tvorbu prirodzenej imunity.

## 8. ZÁVER

Väčšina týchto alternatívnych metód je v súčasnosti v štádiu vývoja a intenzívneho výskumu. Pravdepodobne potrvá ešte určitý čas, kým sa z nich stanú komerčne, spoľahlivé, účinné a zdravotne i environmentálne vyhovujúce súčasťou komplexných protiparazitárnych programov.

Preto by malo byť spoločnou snahou chovateľov, veterinárnych lekárov a napokon i samotných výrobcov liečiv, postupovať pri chemoterapeutických odčervovacích akciách tak, aby sa nevytvárali predpoklady pre vznik rezistencie voči používaným antihelmintikám.

V súčasnosti sa nevyužíva dostatočne celý sortiment prípravkov, ktoré náš trh ponúka. Hoci účinnosť benzimidazolových a avermektínových antihelmintík je zatiaľ viacmenej spoľahlivá, pri spôsobe, akým boli používané doteraz, hrozí, že rezistencia voči nim môže v blízkej budúcnosti negatívne ovplyvniť ekonomiku našich chovov. Príčiny vzniku, výskyt a opatrenia proti nástupu rezistencie voči antihelmintikám sú podrobnejšie opísané aj v našej tlači (Veselý a i., 1992; Praslička a Várady, 1993; Praslička 1994b, 1995b; Praslička a Čorba, 1995). Opätovne pripomíname niekoľko opatrení, pomocou ktorých možno nástupu rezistencie predísť, alebo ho aspoň oddialiť. Týkajú sa správneho používania liečiv, chovateľských opatrení a prevencie.

- Používanie správnych dávok účinných antihelmintík. Podanie nízkej dávky liečiva odstráni len najcitlivejšie jedince z populácie parazitov. Tie, ktoré majú určitý stupeň odolnosti, ostávajú a dajú základ novým, rezistentným generáciám.
- Zníženie frekvencie dehelmintizácií. Častý kontakt liečiva s parazitom umožňuje jeho rýchlejšiu adaptáciu, urýchľuje selekciu odolných jedincov a nástup rezistencie.

- Striedanie používaných liečiv. Použitie iného liečiva odstráni aj tie jedince, ktoré získali určitý stupeň odolnosti voči predtým používanej látke.
- Aplikácia iných metód. Rôzne chovateľské a pastevné opatrenia (primeraná intenzita chovu, zoohygiena, striedanie pasienkov) znižujú možnosť reinfekcie a môžu znížiť potrebu častých dehelmintizácií.
- Opatrenia pri presunoch zvierat. Pred a najlepšie aj po presunoch by sa mali zvieratá odčerviť a po presunoch na iné farmy dodržiavať karanténne opatrenia. Sú to opatrenia proti priamej introdukcii rezistentných parazitov prostredníctvom nakazených zvierat.
- Monitorovanie účinnosti dehelmintizácie. Aspoň raz ročne, asi dva týždne po podaní liečiva, urobiť parazitologické koprologické vyšetrenie. Užitočné je tiež viesť dlhodobé záznamy o tom, ktoré prípravky a kedy boli aplikované.

Vysoká prevalencia helmintóz v našich chovoch, ako to dokumentujú práce z rôznych období (Hovorka, 1963; Várady a Praslička, 1993), je dlhodobá. Je preto potrebné i naďalej dodržiavať zaužívanú schému jarných a jesenných dehelmintizácií. Má sa dodržať pravidlo obmieňania antihelmintík, u nás to prakticky znamená striedanie benzimidazolových a avermektínových liečiv. Ak sa jedná o monoinfekciu, možno uplatniť aj liečivá s užším a špecifickým spektrom účinnosti. Pokiaľ ide o dávkovanie antihelmintík, tu platí zásada, že je lepšie mierne predávkovať ako poddávkať.

## 9. LITERATÚRA

- Barron G. L. (1977): The nematode-destroying fungi. *Top. Mycol.*, No. 1.
- Borgsteede F. H. M., Duynn S. P. J. (1989): Lack of reversion of a benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* after six years of levamisole usage. *Res. Vet. Sci.*, 47, 270–272.
- Campbell W. C. (1986): Historical introduction. In: Campbell W. C., Rew R. S. (eds.): *Chemotherapy of Parasitic Diseases*. New York, Plenum Press. 3–30.
- Coles G. C., Roush R. T. (1992): Slowing the spread of anthelmintic resistant nematodes of sheep and goats in the United Kingdom. *Vet. Rec.*, 130, 505–510.
- Čorba J. (1994): Pokroky v terapii a prevencii parazitóz zvierat. *Slov. Vet. Čas.*, 19, 120–123.
- Čorba J., Várady M., Praslička J., Veselý L. (1993): Antihelmintické ovplyvnenie polyrezistentných gastrointestinálnych nematódov u importovaných kôz. *Vet. Med. – Czech*, 38, 369–374.
- Dineen J. K. (1985): Host and host responses: alternative approaches to control of parasites and parasitic diseases. In: Anderson N., Waller P. J. (eds.): *Resistance in Nematodes to Anthelmintic Drugs*. Melbourne, CSIRO. 149–157.
- Dineen J. K., Wagland B. M. (1982): Immunoregulation of parasites in natural host-parasite systems – with special reference to gastrointestinal nematodes of sheep. In: Symons L. E. A., Donald A. D., Dineen, J. K. (eds.): *Biology*

- and Control of Endo-parasites. Sydney, Australia, Academic Press. 297–329.
- Donald A. D., Waller P. J., Dobson R. J., Axelsen A. (1980): The effect of selection with levamisole and benzimidazole resistance in *Ostertagia* spp. in sheep. *Int. J. Parasitol.*, *10*, 381–389.
- Emery D. L., Wagland B. M. (1991): Vaccines against gastrointestinal nematode parasites of ruminants. *Parasitol. Today*, *7*, 347–349.
- Fuhrman J. A., Lane W. S., Smith R. F., Piessens W. F., Perler F. B. (1992): Transmission-blocking antibodies recognize microfilarial chitinase in Brugian Lymphatic Filariasis. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, *89*, 1548–1552.
- Gronvold J., Korsholm H., Wolstrup J., Nansen P., Henriksen S. A. (1985): Laboratory experiments to evaluate the ability of *Arthrotrix oligospora* to destroy infective larvae of *Cooperia* species, and to investigate the effect of physical factors on the growth of the fungus. *J. Helminthol.*, *59*, 119–125.
- Hall C. A., Ritchie L., McDonnell P. A. (1981): Investigations of anthelmintic resistance in gastro-intestinal nematodes from goats. *Res. Vet. Sci.*, *31*, 116–119.
- Hall C. A., Ritchie L., Kelly J. D. (1982): Effect of removing anthelmintic selection pressure on the benzimidazole resistant strain of *Haemonchus contortus* and *Trichostrongylus colubriformis* in sheep. *Res. Vet. Sci.*, *33*, 54–57.
- Herd R. P., Streitel R. H., McClure K. E., Parker C. F. (1984): Control of hypobiotic and benzimidazole resistant nematodes of sheep. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, *184*, 726–730.
- Hovorka J. (1963): Helminthostatus domácích přežuvacov v ČSSR. In: *Helminty a helminto-hostiteľské vzťahy*. Bratislava. Vydavateľstvo SAV. 115–184.
- Jarrett W. F. H., Jennings F. W., McIntyre W. I. M., Mulligan W., Urquhart G. M. (1955): Immunological studies on *Dictyocaulus viviparus* infection. Passive immunization. *Vet. Rec.*, *67*, 291–296.
- Kelly J. D., Hall C. A. (1979): Resistance of animal helminths to anthelmintics. *Adv. Pharmacol. Chemother.*, *16*, 89–128.
- Larsen M., Wolstrup J., Henriksen S. A., Dackman C., Gronvold J., Nansen P. (1991): *In vitro* stress selection of nematophagous fungi for biocontrol of parasitic nematodes in ruminants. *J. Helminthol.*, *65*, 193–200.
- Le Jambre L. F. (1984): Genetic control of *Haemonchus*. In: Dineen J. K., Outteridge P. M. (eds.): *Immunogenetic approaches to the control of endoparasites with particular reference to parasites of sheep*. Australia, CSIRO. 78–88.
- Maingi N., Scott M. E., Prichard R. K. (1990): Effect of selection pressure for thiabendazole resistance on fitness of *Haemonchus contortus* in sheep. *Parasitology*, *100*, 327–335.
- Martin P. J. (1990): Ecological genetics of anthelmintic resistance. In: Martin P. J., Roush R. T. (eds.): *Resistance of Parasites to Antiparasitic Drugs*. Rahway, USA, MSD AGVET. 129–139.
- McKenna P. B. (1990): The use of benzimidazole-levamisole mixtures for the control and prevention of anthelmintic resistance in sheep nematodes: an assessment of their likely effect. *N. Z. Vet. J.*, *38*, 45–49.
- Murray R. K. (1989): Molecular vaccines against animal parasites. *Vaccine*, *7*, 291–299.
- Nordbring-Hertz B. (1988): Nematophagous fungi: strategies for nematode exploitation and for survival. *Microbiol. Sci.*, *5*, 108–116.
- Peacock R., Poynter D. (1980): Field experience with a bovine lungworm vaccine. In: Taylor A. E. R., Muller R. (eds.): *Vaccines Against Parasites*. Symp. Br. Soc. Parasitol., *18*, 141–148.
- Praslička J. (1994a): Controlling the spread of anthelmintic resistance. *Veter. Rec.*, *135*, 607.
- Praslička J. (1994b): Širokospektrálne anthelmintiká pre malé prežúvavce: ako ich správne používať. *Slov. Vet. Čas.*, *19*, 32–35.
- Praslička J. (1995a): Some aspects of the spread of anthelmintic resistance. *Helminthologia*, *32*, 75–76.
- Praslička J. (1995b): Osobitost dávkovania anthelmintík u kôz. *Slov. Vet. Čas.*, *20*, 123–124.
- Praslička J., Čorba J. (1995): Rezistencia k anthelmintikám u nematódov oviec a kôz. *Vet. Med. – Czech*, *40*, 257–260.
- Praslička J., Várady M. (1993): Rezistencia gastrointestinálnych nematódov voči odčervovacím prípravkom. *Náš chov*, *53*, 31.
- Praslička J., Várady M., Čorba J. (1994a): Výskyt rezistentných nematódov v chovoch oviec a kôz na Slovensku. *Slov. Vet. Čas.*, *19*, 115–119.
- Praslička J., Várady M., Čorba J. (1994b): Persistent infection with multiple anthelmintic resistant gastrointestinal nematodes in Cashmere goats. *Vet. Res. Comm.*, *18*, 443–446.
- Praslička J., Pilko P., Várady M., Čorba J. (1995): Nález gastrointestinálnych nematódov rezistentných k levamisolu a tetramizolu u oviec. *Vet. Med. – Czech*, *40*, 45–48.
- Prichard R. K. (1990): Anthelmintic resistance in nematodes: extent, recent understanding and future directions for control and research. *Int. J. Parasitol.*, *20*, 515–523.
- Procházka Z., Tománek J. (1968): Some practical aspects on the production of radiation vaccines against helminthic diseases. In: *Isotopes and Radiation in Parasitology*. Vienna, International Atomic Energy Agency. 21–33.
- Schillhorn van Veen T. W. (1997): Sense or nonsense? Traditional methods of animal parasitic disease control. *Vet. Parasitol.*, *71*, 177–194.
- Shahabuddin M., Lemos F. J. A., Kaslow D. C., Jacobs-Lorena M. (1996): Antibody-mediated inhibition of *Aedes aegypti* midgut trypsin blocks sporogonic development of *Plasmodium galinaceum*. *Infect. Immun.*, *64*, 739–734.
- Smith T. S., Munn E. A. (1991): Strategies for vaccination against gastrointestinal nematodes. *Rev. Sci. Technol. O.I.E.*, *9*, 577–595.
- Tománek J. (1971): Radiační vakína proti diktyokaulóze skotu. *Vet. Med. (Praha)*, *16*, 187–192.
- Van Wyk J. A., Schalkwyk P. C. (1990): A novel approach to the control of anthelmintic resistant *Haemonchus contortus* in sheep. *Vet. Parasitol.*, *35*, 61–69.
- Várady M., Čorba J. (1997): Resistance of equine small strongyles to benzimidazoles in Slovak Republic. *Helminthologia*, *34*, 81–85.

- Várady M., Praslička J. (1993): Výskyt a druhové zastúpenie gastrointestinálnych nematódov v chovoch oviec na Slovensku. *Veterinárstvi*, *43*, 142–143.
- Várady M., Praslička J., Čorba J., Veselý L. (1993): Multiple anthelmintic resistance of nematodes in imported goats. *Vet. Rec.*, *132*, 387–388.
- Várady M., Praslička J., Čorba J. (1994): Treatment of multiple resistant field strain of *Ostertagia* spp. in Cashmere and Angora goats. *Int. J. Parasitol.*, *24*, 335–340.
- Veselý L., Praslička J., Várady M., Čorba J. (1992): Rezistencia nematódov voči antihelmintikám. *Veterinárstvi*, *42*, 54–55.
- Waller P. J. (1987): Anthelmintic resistance and the future for roundworm control. *Vet. Parasitol.*, *25*, 177–191.
- Waller P. J. (1993): Towards sustainable nematode parasite control of livestock. *Vet. Parasitol.*, *48*, 295–309.
- Waller P. J. (1997): Sustainable helminth control of ruminants in developing countries. *Vet. Parasitol.*, *71*, 195–207.
- Waller P. J., Lacey E. (1985): Nematode growth regulators. In: Anderson N., Waller P. J. (eds.): Resistance of Nematodes to Anthelmintic Drugs. Australia, CSIRO. 137–147.
- Waller P. J., Lacey E. (1986): The effect of triflumuron (SIR8514) on the free-living stages of sheep nematodes. *Vet. Parasitol.*, *21*, 119–126.
- Waller P. J., Larsen M. (1993): The role of nematophagous fungi in the biological control of nematode parasites of livestock. *Int. J. Parasitol.*, *23*, 539–546.
- Waller P. J., Dobson R. J., Donald A. D. (1983): Further studies of the effect of selection with levamisole on a benzimidazole resistant population of *Ostertagia* spp. of sheep. *Int. J. Parasitol.*, *13*, 463–468.

Received: 98–05–11

Accepted after corrections: 98–11–10

---

**Kontaktná adresa:**

MVDr. Ján Praslička, CSc., Ústav experimentálnej veterinárnej medicíny, Hlinkova 1/A, 040 01 Košice, Slovenská republika  
Tel. +421 95 633 18 16, fax +421 95 633 18 53, e-mail: praslicka@uvm.sk; praslicka@yahoo.com

---

Oznamujeme čtenářům a autorům našeho časopisu,

že v návaznosti na časopis *Scientia agriculturae bohemoslovaca*, který až do roku 1992 vycházel v Ústavu vědeckotechnických informací Praha, vydává od roku 1994

Česká zemědělská univerzita v Praze

časopis

## **SCIENTIA AGRICULTURAE BOHEMICA**

Časopis si zachovává původní koncepci reprezentace naší vědy (zemědělství, lesnictví, potravinářství) v zahraničí a jeho obsahem jsou původní vědecké práce uveřejňované v angličtině s rozšířenými souhrny v češtině.

Časopis je otevřen nejširší vědecké veřejnosti a redakční rada nabízí možnost publikace pracovníkům vysokých škol, výzkumných ústavů a dalších institucí vědecké základny.

Příspěvky do časopisu (v angličtině, popř. v češtině či slovenštině) posílejte na adresu:

**Česká zemědělská univerzita v Praze**

**Redakce časopisu *Scientia agriculturae bohemica***

**165 21 Praha 6-Suchdol**

## GRANT AGENCY OF THE CZECH REPUBLIC: INCREASING INFLUENCE ON RESEARCH

### VÝZNAM GRANTOVÉ AGENTURY ČESKÉ REPUBLIKY STOUPÁ

Grant Agency of the Czech Republic has an increasing influence on research by supporting the research projects in all fields of science, including agriculture and veterinary medicine. Budgets of both research institutes and universities are supported through grant resources for purchasing scientific instruments and materials and for increasing salaries of researchers. Subsequently required research outputs are publications in peer reviewed journals.

Grantová agentura České republiky podporuje svými granty výzkum ve všech oborech. Získání grantu závisí na schopnosti navrhovatelů projektů prokázat předpoklady dobrého využití poskytnutých prostředků. Především musí přesvědčivě uvést CO hodlají sledovat, PROČ to považují za důležité a JAK chtějí svoje hypotézy ověřit. Důležité je také KDO a KDY se bude na řešení podílet. Zkušenosti pracovníci, kteří již svými výsledky, uveřejněnými v časopisech s náročným lektorským řízením, prokázali schopnosti a spolehlivost, mají jednoznačnou výhodu před začátečníky, kterým je nutno doporučovat, aby svoje síly a nápady spojili nejprve s těmi, o jejichž předpokladech pro řízení výzkumného týmu nemožou být pochybnosti. Naopak těm, kteří již možnost použití finančních prostředků Grantové agentury ČR nebo jiných zdrojů měli a nenaplnili svoje sliby, musí být přístup k dalším prostředkům omezen nebo zcela uzavřen. Hodnocení návrhů není jednoduché a nikdy nebude zcela objektivní. Nároky na oponenty, zpravodaje a členy podborových a oborových komisí však musí být jednoznačné: nelze podporovat návrhy, které neobsahují jasné záměry a návrhy experimentálního postupu a které tak předem vylučují možnost hodnocení, zda řešení probíhalo podle představ navrhovatelů, schválených vstupním hodnocením projektu. Nové uveřejněné informace i vlastní výsledky mohou být vážným důvodem pro změnu původně předpokládaného postupu. Nezbytné změny je však vždy možné zdůvodnit a bylo by zcela pošetilé nebrat pádné a podložené důvody pro změny projektu v úvahu. Proto nelze připustit názory, že podrobný projekt omezuje tvůrčí svobodu řešitelů nebo že je možné podávat pouze návrhy na financování již provedených pokusů.

Hodnocení ukončených projektů musí být založeno na uveřejněných a lektorovaných výsledcích. Lektorské řízení, zejména v mezinárodních a zahraničních časopisech, je nezávislé na pracovištích autorů i na grantovém systému, který projekt financoval. Časté námitky, že není možné publikace pro nedostatek času předložit již při ukončení tříletých grantů neobstojí, protože výsledky lze doložit i rukopisem zaslaným nebo již přijatým k uveřejnění a dodatečným předložením separátu. Pokud jsou autoři věrohodní, jakými měli být již při posuzování přihlášky, a během řešení vyšly jejich další práce z předchozí činnosti, je jen malé riziko, že jejich práce bude odmítnuta. Přesto je třeba za přesvědčivé výsledky považovat až publikace, doložené separátními výtisky třeba i za jeden až dva roky po ukončení řešení. Za nedostatek není považováno financování projektu z více zdrojů, musí však být zaručeno, že rozsah řešení a souhrn výsledků odpovídají souhrnu prostředků. Výsledky, související s grantovým projektem,

mohou být uveřejněny již v prvním roce řešení, ačkoliv jejich část mohla být získána již před přidělením grantu. Většina dobrých projektů nevzniká náhlým osvěcením navrhovatelů a je založena na jejich dlouhodobé a cílevědomé činnosti. Přesah publikací přes časové hranice grantů je proto příčinou i důsledkem odpovědně uděleného grantu. Nezbytný je však vždy údaj o podpoře projektu Grantovou agenturou ČR a soulad metodiky a zaměření uveřejněné práce s projektem.

Často bývá kladena otázka, jak posuzovat náročnost a význam časopisů. Jejich impakt faktor je rozhodně důležitým kritériem, protože časopis s vysokým impakt faktorem sotva uveřejní špatnou práci. Zcela vyloučeno není naopak odmítnutí dobré práce a autoři musí někdy hledat pochopení jinde. Schopnost odhadnout svoje možnosti a předpoklad úspěchu je však jednou z důležitých vlastností dobrého vědeckého pracovníka. Při posuzování hodnoty impakt faktoru se také musí přihlížet k oborům, protože hodnoty impakt faktoru nejlepších časopisů oboru se mezi obory velmi liší. Zcela se musí opustit přijímání výsledků, uveřejňovaných v odborných časopisech bez lektorského řízení nebo s lektorským řízením velmi tolerantním, výsledků zveřejněných plakátovým sdělením na konferencích nebo uveřejněných jako abstrakt přednášek bez popisu metodiky a doložení získaných výsledků. Tyto publikace mají určitý význam pro celkové zhodnocení aktivity řešitelů, ale nemožou nahradit publikaci výsledků v dobrém časopisu. Účast na mnoha zahraničních konferencích bez uveřejnění původních experimentálních prací může být někdy i příčinou nedostatečné intenzity experimentální práce, věnované vlastním řešení projektu. Může být také projevem neodpovědného hospodaření nebo zbytečným rizikem zneužití dosažených výsledků, protože jejich přednesení na konferenci nezajišťuje autorům prioritu. Grantová agentura ČR podporuje účast řešitelů na konferencích v zahraničí. Očekává však zřetelné ovlivnění řešení projektu zlepšením interpretace dosažených výsledků, navázáním nových kontaktů, předložením návrhů společných projektů, pozváním k přednáškám, nabídkou studijních pobytů i zájmem o pobyt na našich pracovištích. Je na řešitelích, kteří se s podporou Grantové agentury ČR zúčastnili konference v zahraničí, aby podrobnou zprávu, kterou by stejně měli předložit svému zaměstnavateli a která je vyžadována jako příloha ke zprávě o řešení grantu, přesvědčili o dobře vynaložených prostředcích. Lakonické sdělení, že bylo vystaveno plakátové sdělení a nic neřikající abstrakt o deseti řádcích by rozhodně neměly stačit ke kladnému hodnocení cesty a neměly by umožňovat financování účasti na dalším kongresu.

U projektů, které nemají experimentální charakter nebo při jejichž řešení byly získány výsledky, které je nutno patentovat, jsou samozřejmě možné odchylky od požadavku publikací jako základního kritéria hodnocení výsledků. Výjimečně mohou být oponentním projednáním ukončeny projekty, které neposkytly výsledky vhodné k uveřejnění. V těchto případech by oponentní jednání mělo doložit, že řešitelé skutečně vycházeli ze správných předpokladů, že splnili všechny v návrhu uvedené postupy a přesto není jejich chybou, že výsledkem řešení nejsou požadované publikace.

Výzkumné zprávy ze šedesátých až osmdesátých let nebo referáty na konferencích, uskutečněných před několika lety, jejichž výsledky nebyly dosud publikovány, nemohou nahrazovat nedostatek věrohodných publikací nejen v přehledech literatury grantových přihlášek, ale ani v životopisech navrhovatelů. O podobné citace se nemohou opírat ani uveřejněné výsledky řešení grantu, protože zcela zpochybňují věrohodnost jejich lektorského posouzení. Zpravodajové a hodnotitelé výsledků musí také sledovat, zda uveřejněné výsledky odpovídají projektu. Musí se k záměrum projektu a k nákladům vynaloženým na jeho řešení vrátit a musí slibované postupy v předložených publikacích vidět. Jen takto komplexně posouzené výsledky řešení mohou být podkladem pro vyslovení absolutoria řešitelům.

Grantové projekty jsou vynikajícím stimulem k zvýšení publikační aktivity a k výchově odpovědných řešitelů a náročných a objektivních hodnotitelů. Kromě publikací vedou také k vytváření pracovních týmů z různých pracovišť, umožňují získání nových přístrojů, usnadňují konfrontaci s řešiteli podobných problémů v zahraničí. To všechno jsou nesporné přínosy k postupnému zlepšování výsledků našich pracovišť a k vyrovnání rozdílů, které jsou mezi námi a vyspělým světem. Přihlášky grantů i výsledky jeho řešení musí být kriticky posuzovány. Nejde jen o vytvoření pestrého pracovního týmu z mnoha pracovišť. Každý spoluřešitel musí mít konkrétní a kontrolovaný úkol. Řešitelé „pro jméno“ nebo „pro přístroj“ a pracovníci s vědeckými hodnotami, vykonávající technické nebo rutinní práce, nemají být vydáváni za tvůrčí spolupracovníky. Publikace deseti nebo patnácti autorů jsou často podezřelé a stojí za to si všimnout, jaký je podíl jednotlivých autorů na dosažených výsledcích. Pořízené přístroje, zakoupená pokusná zvířata a drahé chemikálie musí být při řešení použity. Cesty do zahraničí musí být ve výsledcích také vidět, např. v uskutečněné spolupráci, v projednaných studijních pobytech, v připomínkách k rukopisům publikací, v společných projektech podaných v zahraničí nebo doma, v přínosu nových prostředků, ve využití u nás nedostupných metod, v pozvání k přednáškám, ve vyžadovaných lektorských posudcích, ve jmenování do redakčních rad, programových a organizačních výborů kongresů, v pověření moderováním diskusí apod. To vše zvyšuje mezinárodní kredit

navrhovatelů a řešitelů a musí to být při jejich hodnocení oceňováno.

Pokud budou přihlášky zpracovávány a výsledky hodnoceny s dodržováním uvedených zásad, bude mít Grantová agentura ČR méně problémů. I řešitelé budou mít méně důvodů k pocitu neobjektivního hodnocení a vynaložené prostředky, které již dosahují téměř jedné miliardy korun ročně, budou vysoce návratné. Výzkum je dnes velmi náročnou činností, usnadňovanou současnými informačními technologiemi a přístroji. O to víc musí být projekt dobře připraven a hypotéza stanovena po důkladném studiu literatury. Řešení musí být dobře promyšleno a rozděleno mezi členy týmu tak, aby umožňovalo potvrzení nebo jednoznačné vyvrácení hypotézy. Kvantitativní výsledky je třeba kvalifikovaně statisticky vyhodnotit a připravovat k uveřejnění ve správně vybraném časopisu již při plánování pokusů a v průběhu řešení. Nestačí, aby o výjimečnosti výsledků byli přesvědčeni jejich autoři. Naopak autoři musí o věrohodnosti výsledků přesvědčit lektory a odbornou veřejnost. V současné době nelze očekávat objevy, získané odvážným vyjetím do málo známého teritoria a zběsilým mánáním sítkou na motýly v naději, že v ní uvízne dosud nepopsaný exemplář, s jehož určením pomůže chudý, ale hodný univerzitní profesor, který si po návratu „badatele“ z exotické ciziny bude pokládat za čest mu pomoci s připojením jeho jména k jménu nově objeveného druhu.

Musíme skončit s někdy až neuvěřitelnou neznalostí problému před začátkem jeho řešení a s vydáváním výsledků, které je možno zjistit už i v Internetu, za převrácené objevy. Musíme podporovat činnost již úspěšných a vznik nových vědeckých škol, kde doktorandi navazují na znalostní soubory úspěšných předchůdců, kde možnostmi současné techniky a moderními metodami se doplňují metodiky po léta používané a dokonale zvládnuté, kde správná laboratorní praxe není teprve předmětem školení, kde zkušení považují za svoji povinnost vrátit nováčkům to, co sami považovali za samozřejmé při svých začátcích. U nás je často osamocenenost programem. Starší se nechťjí o svoje zkušenosti dělit – přece je také museli sami pracně získat – a mladí nechťjí být zavázáni k „vděčnosti“ a raději vyhledají vlastní kolej, která je často notně zrezivělá a nikam nevede. Tam se plahočí a jsou spokojeni když svůj vozík postrčí o píď a ani jim nevadí, že po hlavních kolejích frčí moderní rychlovlaky. Často si však stěžují, že jsou umazáni od šmiru a nemají parádní uniformu.

Jistě trochu přeháním, ale je na nás všech svými výsledky stále dokazovat, že přeháním zbytečně. Rozhodím prosím, aby se zbytečně necítili dotčeni ti, kterých se nic z uvedeného netýká a aby moje poznámky nebyly zneužity k znevážení činnosti Grantové agentury ČR. Nebylo by to spravedlivé, protože k překonávání problémů našeho výzkumu Grantová agentura ČR od svého vzniku hodně přispěla.

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 nemá přesáhnout 10 stran psaných na stroji včetně tabulek, obrázků a grafů. V práci je nutné používat jednotky odpovídající soustavě měrových jednotek SI.

**Rukopis** má být napsán na papíře formátu A4 (30 řádek na stránku, 60 úhozů na řádku, mezi řádky dvojitě mezery). K rukopisu je vhodné přiložit disketu s textem práce, popř. s grafickou dokumentací pořízenou na PC s uvedením použitého programu. Tabulky, grafy a fotografie se dodávají zvlášť, nepodlepují se. Na všechny přílohy musí být odkazy v textu.

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

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

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

**Rozšířený souhrn** prací v češtině nebo slovenštině je uveřejňován v angličtině, měly by v něm být v rozsahu ca 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 informaci, proč byla práce provedena.

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

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

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

**Literatura** 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 PSC, číslo telefonu a faxu, popř. e-mail.

Úplné znění pokynů pro autory s dodatky najdete na URL adrese <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

For full text of instruction for authors see <http://www.clark.cz/vri/Pokyny.htm>

## 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 44, No. 3, March 1999

## CONTENTS

Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K.: DI-2-ethylhexyl phthalate and di-n-butyl phthalate in the tissues of pigs and broiler chicks after their oral administration (in English).....	61
Makarevich A., Sirotkin A.: Development of a sensitive radioimmunoassay for IGF-I determination in samples from blood plasma and cell-conditioned medium (in English) .....	71
SHORT COMMUNICATION	
Chrenek P., Vašíček D., Makarevich A., Gajarská T., Gastnerová I., Bulla J.: Detection of human protein C gene integration in transgenic rabbits by polymerase chain reaction (in English).....	79
REVIEW ARTICLE	
Praslička J., Letková V., Lukešová D.: Alternatives for nematode control in connection with anthelmintic resistance .....	83
INFORMATION	
Hruška K.: Grant Agency of the Czech Republic: Increasing Influence on Research .....	91

# VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

---

Ročník 44, č. 3, Březen 1999

## OBSAH

Jarošová A., Gajdůšková V., Raszyk J., Ševela K.: DI-2-ethylhexyl ftalát a di-n-butyl ftalát ve tkáních prasat a kuřecích brojlerů po orálním podání .....	61
Makarevich A., Sirotkin A.: Rozpracovanie citlivej radioimunoanalýzy pre stanovenie IGF-I vo vzorkách krvnej plazmy a bunkami kondicionovaného média.....	71
KRÁTKÉ SDĚLENÍ	
Chrenek P., Vašíček D., Makarevich A., Gajarská T., Gastnerová I., Bulla J.: Detekcia integrácie génu humánneho proteínu C u transgénnych králikov metódou polymerázovej reťazovej reakcie....	79
PŘEHLED	
Praslička J., Letková V., Lukešová D.: Alternatívy pre tlenie nematodóz v súvislosti s rezistenciou voči antihelmintikám .....	83
INFORMACE	
Hruška K.: Význam Grantové agentury České republiky stoupá .....	91

---

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA ● Vydává Ústav zemědělských a potravinářských informací ● Redakce: Slezská 7, 120 56 Praha 2, tel.: 02/24 25 79 39, fax: 02/24 25 39 38 ● Sazba: Studio DOMINO – ing. Jakub Černý, Bří. Nejedlých 245, 266 01 Beroun, tel.: 0311/229 59 ● Tisk: ÚZPI Praha ● © Ústav zemědělských a potravinářských informací, Praha 1999

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