

SBORNÍK
ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Živočišná výroba

11

10/15

ROČNÍK 5 (XXXIII) – PRAHA, LISTOPAD 1960

CENA 10 Kčs

Československé akademie zemědělských věd

ŽIVOČIŠNÁ VÝROBA

Rídí redakční rada: *akademik Vladimír Koželuha (předseda), akademik Karel Koubek, dopisující člen ČSAZV dr. inž. Josef Šmerha, dopisující člen ČSAZV prof. dr. inž. Josef Kopecký, doktor zemědělských věd prof. dr. inž. Jan Podhradský, dopisující člen dr. inž. Jaroslav Herzig, dr. inž. Andrej Karakoz, dr. inž. František Volf, inž. Růžena Vančíková. — Vedoucí redaktor František Němec.*

© Československá akademie zemědělských věd, Praha 1960

Obsah — Содержание — Content — Inhalt

- Jančařík A.: Povaha základního výzkumu v živočišné výrobě 839
- Bartoš S., Hatleová A., Kafka K.: Příspěvek k poznání změn glykémie a obsahu TMK v krvi červenostřakatého skotu během ontogenézy
 К вопросу изучения изменений гликемии и содержания летучих жирных кислот в крови краснопестрого крупного рогатого скота
 A Contribution to the Knowledge of Changes of Glycaemia and the Content of Volatile Fat Acids in the Blood of Red Spotted Cattle 843
- Bartoš S.: Úloha kyseliny octové a propionové při syntéze glykogenu v játrech skotu
 Роль уксусной и пропионовой кислот при синтезе гликогена в печени крупного рогатого скота
 The Role of the Acetic and Propionic Acid in the Synthesis of Glycogene in the Liver of Cattle 851
- Bartoš S., Hatleová A., Halašová E.: Metoda stanovení veškerých tekavých mastných kyselin v krvi skotu
 Метод определения всех летучих жирных кислот в крови крупного рогатого скота
 Methode der Feststellung von gesamten flüchtigen Fettsäuren im Blute der Rinder 857
- Jančařík A.: Teplotní charakteristika slezových proteáz tele
 Температурная характеристика протеаз сычуга теленка
 Temperaturcharakteristik der Kalblabmagenproteasen 863
- Jančařík A.: Proteolytická účinnost elektroforetických frakcí extraktu sliznice slezu tele
 Протеолитическое действие электрофоретических фракций экстракта из слизистой оболочки сычуга теленка-сосуна
 Proteolytische Wirksamkeit einiger elektrophoretischen Fraktionen des Schleimhautextraktes von Kalbmägen 869

Povaha základního výzkumu v živočišné výrobě

Dr. Antonín JANČAŘÍK

Základním biologickým předpokladem pro úspěšnou práci zootechnickou, především však pro dosažení trvale vyšší úrovně užítkovosti domácích zvířat, je sladění činnosti všech ústrojových systémů v těle hospodářského živočicha mezi sebou a uvedení celkové tělesné činnosti hospodářského zvířete v soulad s jeho prostředím. Význam poznání základních biologických dějů pro progresivní živočišnou výrobu není snad vůbec třeba zvlášť zdůvodňovat. Pozornosti si však zato zaslouží spíše otázka, zda základní výzkum životních projevů hospodářských zvířat, a to přímo pod aspektem jejich sladění ve smyslu trvalého zvyšování užítkovosti, je totožný s obecným biologickým výzkumem živočišstva vůbec nebo zda má své specifické stránky.

Vědecká bádání posledních let přinesla v tomto směru četné pozoruhodné výsledky. Bude proto zcela na místě uvést o nich několik poznámek v tomto tematickém čísle, obsahujícím původní a metodické práce z fyziologie, biochemie atd. hospodářských zvířat.

Je nesporným faktem, že se hospodářská zvířata nejen svou morfologií, ale především svou fyziologií značně liší od svých předků, kteří žili ve stavu volném (divokém). Tyto změny jsou v mnohém směru tak hluboké, že u některých druhů vystává otázka, ne vždy snadno řešitelná, který druh — ať již vymřelý nebo žijící — je vlastním předkem příslušného druhu hospodářských zvířat. Tyto velké změny se připisují působení dlouhodobého biologického procesu — domestikaci. Objektem vědecké práce zootechnika a pracovníků přidružených základních oborů je živočich domestikovaný, kdežto zoolog (v širším smyslu slova) studuje především živočichy volně (divoce) žijící, třeba i téhož rodu jako jsou živočichové domestikovaní. Mezi oběma skupinami živočichů — domestikovaných a nedomestikovaných — se postupem času vytvořilo poměrně ostré rozdělení, jež dokonce vedlo tak daleko, že biologická problematika domestikovaných zvířat nebyla a namnoze ani dnes ještě není oborem bádání a výuky na vysokých školách s obecně biologickou náplní.

V ostrém kontrastu proti tomu jsou zase práce Darwinovy a četných pracovníků v genetice, fyziologii, biochemii atd., kteří právě ze studia hospodářských zvířat vyvodili četné obecně platné poznatky. Otázkou dalekosáhlého praktického i theoretického dosahu je, zda poznatky o volně žijících živočiších se dají přímo aplikovat na hospodářská zvířata nebo zda tato mají své specifické zvláštnosti, jež je nutno respektovat. Úplnou odpověď na tuto otázku může být jen vysvětlení podstaty samotné domestikace.

Výzkumy z posledních let (Herre, Klatt, Kelm, Kesper, Wiarda aj.) ukázaly, že domestikace je vlastně trvalý proces biologické přeměny živočicha vyplývající z jeho styku s člověkem, který účinně zasahuje do úpravy jeho vnějšího i vnitřního prostředí a usměrňuje životní pochody domestikovaného živočicha ve směru svých potřeb. Domestikace je komplexní biologický proces a proto je nutno z ní vyloučit projevy synantropismu, tj. prostou vazbu živočicha na přítomnost člověka bez jeho vlastního působení. U těchto živočichů se také neprojevují znaky domestikace a v podstatě se nemění jejich způsob života (bionomie). Za domestikaci také nelze považovat samotnou dresuru volně žijících zvířat, neboť její působení zůstává omezeno na krátkou dobu, často jen na jednu generaci, kdežto domestikace je proces časově zabírající velký počet generací.

Klatt, Rensch, Herre a jiní upozornili na to, že samotná domestikace působí v některých směrech jednotně na zvířata bez ohledu na to, o který druh živočišný jde. Jsou to především celkové rozměry zvířete, jež se na počátku domestikace zmenšují (celkově) a teprve pokročilá domestikace stadia se vyznačují výskytem obrovitých forem. U volně žijících živočichů jsou uvnitř druhu poměrně malé rozdíly mezi jedinci štíhlými a zavalitými, kdežto u domestikovaných živočichů se uvnitř druhu projevují tyto rozdíly velmi výrazně a jsou namnoze i geneticky fixovány. U živočichů první skupiny (označme je třeba jako „štíhlé“) nacházíme protáhlou lebku v obličejové části, úzký hrudní koš, žebra směřující dozadu, tedy celkově výraznou linii kraniokaudální, kdežto u skupiny druhé je lebka krátká, často v čenichové části zvednutá, hrudní koš prostornější a žebra stojí kolměji k ose páteře. Živočichové druhé skupiny jsou většinou zvířata s menší pohyblivostí, s větším sklonem k ukládání tuku, kdežto v první skupině jde o zvířata s výrazně vyšší hladinou energetického metabolismu. Obecně lze říci, že všechna domestikovaná zvířata se vyznačují méně výrazným pohlavním dimorfismem, mají těžší kůži, větší masu kostní a více tuku. Značné rozdíly byly zjištěny mezi živočichy domestikovanými a nedomestikovanými, pokud jde o poměry v nervové soustavě (na příklad váha mozku u domestikovaných zvířat může být až o 30 % menší), o stavbu cévní-

ho systému a především velké rozdíly jsou ve velikosti mléčných žláz. To vše poukazuje na to, že značné rozdíly ve velikosti (váze) vnitřních orgánů hospodářských zvířat proti zvířatům volně žijícím se projevují i v jejich rozdílech jejich látkového a energetického metabolismu. V tomto směru se dočteme ve vědecké literatuře o pozoruhodných rozdílech v délce střev, o rozdílech ve velikosti a stavbě ledvin, o rozdílných hodnotách krevního obrazu, o nestejných jodových číslech tuku zvířat domestikovaných a nedomestikovaných. Nutno je též upozornit i na tu okolnost, že působením domestikace se projevují u živočichů i takové změny, jaké u volně žijících živočichů téhož druhu nebyly nikdy pozorovány. Jako příklad možno uvést různé formy a především barvy kožního pokryvu nebo modré vaječné skořápky u drůbeže atd. Všechny tyto údaje uvedené většinou jen v náznakových zkratkách zřetelně poukazují na to, že domestikace je tak hluboký zásah do organismu živočicha, že je nutno domestikované živočichy z mnoha stránek považovat za skupinu živočichů biologicky svérázných a odchylných od živočichů volně žijících.

Tato specifická hospodářských zvířat, ať už vzhledem k velikosti a tvaru těla i orgánů nebo ke způsobu života nebo k funkcím jednotlivých orgánů či celého organismu se stává zootechnickými požadavky a zásahy stále výraznější. Tím ovšem není (a nemá být) řečeno, že chovatelství se kryje s pojmem domestikace, i když je podstatnou její složkou. Je třeba vzít v úvahu, že u některých domestikovaných živočichů byly v základu změněny pohlavní cykly, což se projevuje především polyestrismem, persistující laktací nebo trvalou snáškou vajec. Běžnými zootechnickými zásahy stávají se zákroky inseminační stejně jako kastracní téměř u všech druhů hospodářských zvířat, záměrně se podporuje nebo potlačuje adiposita, zvířata se krmí látkami, jež často vůbec nemají obdoby v krmivech zvířat volně žijících. Hospodářským zvířatům se aplikují různé orgánové extrakty nebo syntetické preparáty (na příklad s hormonálními účinky), podrobují se různým fyzikálním podmínkám (teplo, záření atd.) a pod., a aplikace všech těchto faktorů je teleologicky zaměřena k vyšší užitkovosti. Tak užitkovost hospodářských zvířat není jen aspektem vedoucím práci odborníka zootechnika, ale i důležitou směrnicí pro biologa, pracujícího s domestikovanými zvířaty. Zvýšení užitkovosti je pro zootechnika jedním z hlavních měřítek úspěšnosti jeho práce, pro biologa pak, jehož i úspěšná práce většinou nevyústí ve zvýšení užitkovosti studovaných zvířat, je jednou z trvalých podmínek, jež se podílí na utváření životních projevů domestikovaných zvířat. To umožňuje fyziologu, biochemiku, genetikovi hospodářských zvířat, aby nejen výstižněji poznával poměry, z nichž se vyvíjela domestikovaná zvířata, ale současně mu dává možnost vidět i s m ě r, jakým se budou hospodářská zvířata vyvíjet. — T e n t o

*v ý v o j z d e p ř e s t á v á b ý t i p o t o m h y p o t é z o u a s t á v á s e p l á -
n e m. Z n a l o s t t o h o t o p l á n u u m o ž ň u j e p r a c o v a t n a p r o b l é m e c h p e r s p e k t i v n í c h a
z a j i š ť u j e z á k l a d n í m b i o l o g i c k ý m d i s c i p l í n á m v ž i v o č í š n ě v ý r o b ě p o t ř e b n ý p ř e d s t í h
p ř e d z o o t e c h n i c k o u p r a x í.*

*Z u v e d e n ě h o j e z ř e j m o, ž e p r o b l e m a t i k a b i o l o g i c k ý c h d i s c i p l í n h o s p o d á ř s k ý c h
z v í ř a t, i k d y ž n u t n ě m u s í s t a v ě t n a o b e c n ě b i o l o g i c k ý c h p o z n a t c í c h, j e n a p r o s t o
s a m o s t a t n á a s v ě r á z n á a m u s í p ř e d e v š í m v y c h á z e t z h l u b o k ě z n a l o s t i z á k l a d n í c h
b i o l o g i c k ý c h d i s c i p l í n o h o s p o d á ř s k ý c h z v í ř a t e c h a z e z n a l o s t i p r o c e s u d o m e s t i k a c e.
J e s t l i ž e p r o p o z n á n í o b e c n ý c h b i o l o g i c k ý c h z á k o n i t o s t í ž i v o č í c h ů j e p o d k l a d e m s t u -
d i u m ž i v o č í c h ů a j e j i c h p r o j e v ů v p ř í r o d ě, j e p r o ž i v o č í š n o u v ý r o b u n u t n o s t u d o v a t
b i o l o g i c k é z á k o n i t o s t i ú s t r o j n o s t i a ž i v o t n í c h p r o j e v ů ž i v o č í c h ů p ř e t v á ř e n ý c h č l o v ě -
k e m, t j. v p ř ů b ě h u t r v a j í c í h o p r o c e s u d o m e s t i k a c e. P r a c o v n í k v z á k l a d n í c h b i o l o -
g i c k ý c h d i s c i p l í n á c h z o o t e c h n i c k ý c h, k t e r ý v e z m e z a s v o u t u t o k o n c e p c i, z p r o š ť u j e
s e p o c i t u i z o l o v a n o s t i s v ě p r á c e a s o u č a s n ě n a v a z u j e o r g a n i c k é s p o j e n í s n e j b l í ž š í m i
p r a c o v n í m i ú s e k y — j a k o t e o r e t i c k ý m i, t a k i p r a k t i c k ý m i — z í s k á v á s i p ř e h l e d p o
u c e l e n ě o b l a s t i p r o b l e m a t i k y a s v o u t a k t o u s m ě r ě n ě n o u c í l e v ě d o m o u p r a c í z a j i š ť u j e
p ř e d p o k l a d y ú s p ě š n ě h o p l n ě n í ú k o l ů ž i v o č í š n ě v ý r o b y.*

Příspěvek k poznání změn glykémie a obsahu TMK v krvi červenostrakatého skotu během ontogenézy

**К вопросу изучения изменений гликемии и содержания летучих жирных кислот
в крови краснопестрого крупного рогатого скота**

**A Contribution to the Knowledge of Changes of Glycaemia and the Content of
Volatile Fat Acids in the Blood of Red Spotted Cattle**

CSc inž. Stanislav BARTOŠ, PhMr. Alena HATLEOVÁ, † inž. Karel KAFKA
Výzkumný ústav živočišné výroby ČSAZV v Uhřetěvsi

Došlo dne 26. II. 1960

Úvod

Již dříve bylo zjištěno, že koncentrace glukózy v krvi přežvýkavců je vyšší v mládí než v dospělosti. Údaje o tomto poklesu glykémie s věkem uveřejnil již H o d g s o n a spol. (1932). Touto specifickou zvláštností přežvýkavců se postupně zabývala řada autorů, kteří se snažili ve svých pracích podat různá vysvětlení. Většina pracovníků se domnívá, že pokles glykémie přímo souvisí s rozvíjením funkce bachoru, například M c C a n d l e s (1950), C o n r a d (1950), H i b b s (1952), tedy se stoupající utilizací těkavých mastných kyselin. Jiní se domnívají, že pokles glykémie souvisí s přechodem z mléčné výživy na výživu objemnou pící, a že tedy příčina těchto změn je alimentární. J a c o b s o n a spol. (1951) uvádí, že glykémie sice ostře klesá po zastavení krmení mlékem v 6. týdnu stáří, ale připouští též vysvětlení, že vzorky krve byly odebírány 3 hodiny po krmení, a že tedy mohla ještě existovat alimentární hyperglykémie. M u r l e y a spol. (1952) a L a m b e r t a spol. (1955) zjistili, že ani prodloužením výlučně mléčné výživy do dvou měsíců stáří nelze zabránit poklesu glykémie, který je sice v tomto případě o něco pozvolnější, ale ve dvou měsících stáří přece dosáhne stejné hodnoty jako při normálním krmení. K podobným výsledkům dospěl M c C a r t h y (1956), který u tří skupin telat různě krmených (mlékem a objemnou pící) nezjistil žádné odchylky v poklesu glykémie. Je tedy vidět, že alimentární vysvětlení těchto změn je příliš jednoduché a neodpovídá skutečnosti. Příčiny postnatálního poklesu glykémie u přežvýkavců nejsou ještě zcela vysvětleny, avšak nepochybně souvisejí se změnou významu glukózy jako energetického zdroje v metabolismu a musí tedy být v nějaké souvislosti se stoupajícím množstvím těkavých mastných kyselin v krvi. Nezvratnou skutečností však zůstává, že glykémie klesá hlavně v 1. měsíci stáří a obsah těkavých mastných kyselin v krvi stoupá teprve od 3. měsíce stáří, tedy teprve s rozvíjejícími se ruminálními funkcemi. Vývojové křivky těkavých mastných kyselin v krvi pře-

žvýkavců sledoval u jehňat a dospělých ovcí Reid (1950) a McClymont (1951), u koz Craine (1952) a u telat McCarthy (1956).

Je zajímavé, že ačkoliv vývoj glykémie nelze v zásadě alimentárně ovlivnit, je obsah těkavých mastných kyselin v krvi přežvýkavců závislý na potravě a na obsahu těkavých mastných kyselin v bacheru. To potvrdil již Reid (1951), který zjistil, že koncentraci těkavých mastných kyselin v krvi ovcí lze ovlivnit hladověním a dále McCarthy (1956), který dokazuje, že kolísání těkavých mastných kyselin v krvi souvisí s kolísáním jejich koncentrace v bacheru.

Cílem předkládané práce bylo ověřit si literární údaje na tuzemském červenostrakatém plemeni a získat tak základní materiál pro další studium významu těkavých mastných kyselin v metabolismu skotu. Byl studován ontogenetický vývoj glykémie a hladiny těkavých mastných kyselin v krvi, a to jednak u telat od narození až do stáří šesti měsíců a dále u dospělých krav v závislosti na průběhu laktace.

Experimentální část

Metodika

Sledování glykémie a koncentrace těkavých mastných kyselin v průběhu ontogeneze bylo provedeno ve VÚŽV v Uhřetěvsi na skupině šesti červenostrakatých telat ve stáří sedmi dnů v týdenních intervalech do stáří šesti měsíců. Sledování glykémie a koncentrace těkavých mastných kyselin v krvi v průběhu laktace bylo provedeno ve VÚŽV v Uhřetěvsi na skupině šesti tříletých krav červenostrakatého plemene v I. laktaci od 7. dne po otelení, v měsíčních intervalech až do konce 4. měsíce laktace.

Rozdíly v glykémii mezi žilnou krví odtékající z vemene a žilnou krví odebranou z *veny jugularis* byly stanoveny ve VÚŽV ve Víglaš na 11 tříletých kravách siemenského plemene v I. laktaci.

Vzorky krve pro stanovení glukózy a těkavých mastných kyselin byly odbírány z pravé *veny jugularis*. Vzorky žilné krve odtékající z vemene byly odbírány z abdominální externí vény. Krev pro stanovení glukózy byla učiněna nestrážlivou šťavelany a pro stanovení těkavých mastných kyselin fluoridem sodným.

Glukóza v krvi byla stanovena redukcí roztoku kyseliny pikrové za alkalické reakce na červenohnědý roztok kyseliny pikraminové. Intenzita zabarvení roztoku byla měřena v Helligově kolorimetru se srovnávacím klínem podle Creceia-Seiferta (1928).

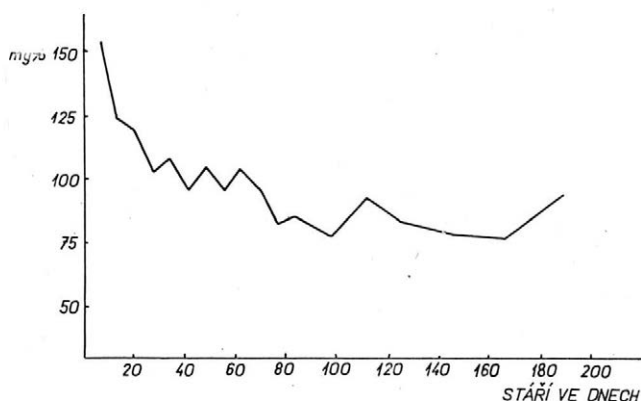
Těkavé mastné kyseliny byly stanoveny destilací vodní párou z filtrátu vzorků krve po sražení bílkovin hydroxydem barnatým a síranem zinečnatým a následující titrací 0,01n ethylátem sodným na bromthymolovou modř podle metody Bartoše a spol. (1959). Veškeré těkavé mastné kyseliny byly vyjadřovány jako kyselina octová, protože kyselina octová — jak bylo zjištěno Reidem (1951), McClymontem (1951) a Crainem a spol. (1951) — tvoří 91 až 100 % (podle molů) obsahu veškerých těkavých mastných kyselin v krvi skotu.

Výsledky pokusů

Hodnoty glykémie sledované v závislosti na věku telat postupně klesaly z původní výše 154,6 mg % ve stáří sedmi dní a dosáhly nejnižší hladiny v 98 dnech stáří, a to 77,1 mg % (tabulka I). Zajímavý je poměrně náhlý pokles glykémie mezi 60. až 90. dnem stáří (graf 1). Od 3. měsíce se již glykémie dále nemění a zůstává v podstatě na stálé výši okolo 80 mg %.

I. Glykémie a obsah těkavých mastných kyselin (TMK) v krvi telat a jejich věk

Stáří ve dnech	Glykémie v mg%	TMK v mg%	Stáří ve dnech	Glykémie v mg%	TMK v mg%
7	154,6	4,7	77	81,9	2,8
14	123,8	3,7	84	84,5	3,2
21	119,2	3,1	91	81,8	3,6
28	102,7	2,0	98	77,1	4,8
35	107,9	2,8	112	92,7	5,4
42	96,1	1,7	126	83,0	7,0
49	104,6	2,1	147	77,8	7,7
56	95,4	2,4	168	76,0	6,6
63	104,0	2,4	189	91,5	6,8
70	95,6	2,6			



Graf 1. Glykémie v mg% ve vztahu k věku telat.

Hodnoty veškerých těkavých mastných kyselin v krvi sledované v závislosti na věku telat postupně stoupaly během 3. a 4. měsíce stáří z hodnoty okolo 2 mg % na 7 mg % (graf 2). Od konce 4. měsíce stáří se již hladina veškerých těkavých mastných kyselin v krvi dále nemění a zůstává přes značné individuální rozdíly u jednotlivých zvířat na výši, která odpovídá hladině veškerých těkavých mastných kyselin v krvi u dospělého skotu (tabulka I a III).

II. Glykémie (v mg%) a průběh laktace

Kráva číslo	Den laktace				
	7	30	60	90	120
292	50,0	65,0	47,3	68,8	75,5
285	66,5	54,5	64,0	64,5	59,5
299	66,0	63,0	59,5	—	68,0
282	49,0	65,5	55,8	59,3	68,3
307	58,0	55,3	63,6	59,0	70,0
311	66,0	60,5	62,0	85,8	—
Průměr	59,3	60,6	58,7	67,5	68,3

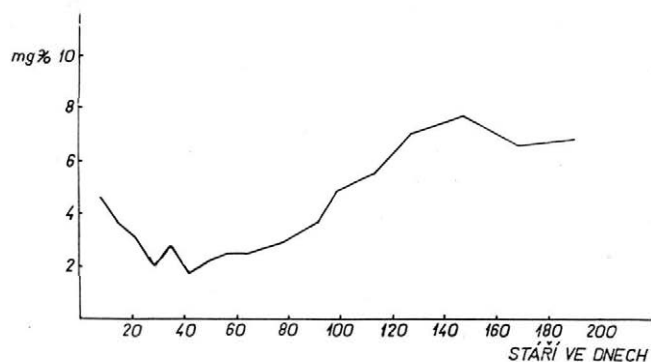
III. Hladiny těkavých mastných kyselin v krvi (v mg%) a průběh laktace

Kráva číslo	Den laktace				
	7	30	60	90	120
292	6,8	6,3	4,6	4,6	6,9
285	8,3	7,2	8,6	4,4	7,6
299	6,9	4,2	5,7	—	5,7
282	4,6	8,6	8,4	5,0	6,3
307	6,0	7,3	6,4	7,2	7,0
311	5,1	4,1	6,5	8,5	—
Průměr	6,3	6,3	6,7	5,9	6,7

IV. Glykémie v krvi odebrané z *veny jugularis* a v krvi odebrané z *veny abdominis externy*

Kráva číslo	Glykémie v mg%		Rozdíl
	<i>vena jugularis</i>	<i>vena abdom. externa</i>	
530	56,0	38,5	17,5
65	52,0	32,3	19,7
317	48,8	33,0	15,8
193	46,8	30,5	16,3
195	45,3	38,3	7,0
319	55,8	37,8	18,0
524	53,8	45,8	8,0
518	54,0	39,8	14,2
521	53,0	31,5	21,5
506	53,0	34,8	18,2
523	49,0	38,0	11,0
398	42,8	33,8	9,0
Průměr	50,9	36,2	14,7

Zajímavý je pokles veškerých těkavých mastných kyselin v krvi telat během prvního měsíce stáří, a to z hodnoty 4,7 mg % ve stáří sedmi dní na hodnotu 1,4 mg % ve stáří 42 dní.



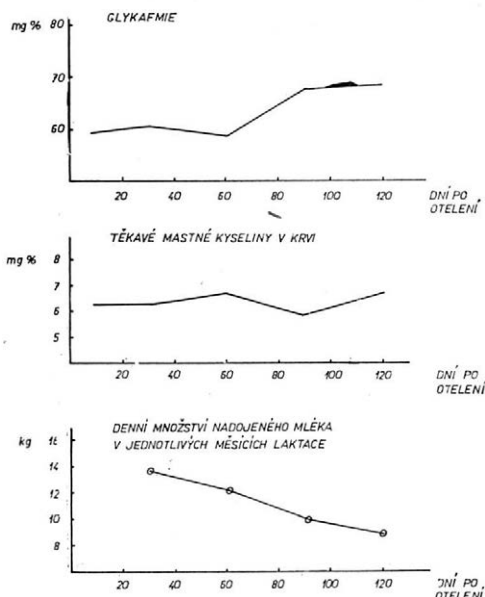
Graf 2. Veškeré těkavé mastné kyseliny v krvi v mg% ve vztahu k věku telat.

Při sledování veškerých těkavých mastných kyselin v krvi u šesti tříletých červenostrakatých krav v laktaci jsme zjistili, že se jejich průměrná hladina prakticky nemění (graf 3). U jednotlivých krav nacházíme ovšem na rozdíl od glykémie v hladině těkavých mastných kyselin v krvi značné individuální výkyvy (tabulka III).

V hodnotách glykémie nacházíme kromě již zmíněných menších individuálních výkyvů u jednotlivých krav i určitou stoupající tendenci z průměrných hodnot kolem 60 mg % během prvních dvou měsíců laktace na 67,5 až 68,8 mg % během 3. a 4. měsíce laktace.

Svá pozorování v tomto pokusu jsme doplnili průměrnými denními hodnotami nadojeného mléka v kg ke konci 1., 2., 3. a 4. měsíce laktace. Průměrná denní dojivost klesá z hodnoty 13,7 kg nadojeného mléka koncem 1. měsíce na 8,9 kg ke konci 4. měsíce (graf 2).

K podepření některých našich závěrů o změnách glykémie během laktace uvádíme ještě rozdíly hodnot glykémie mezi žilnou krví, odtékající z vemene,



Graf 3. Vztah glykémie, hladiny veškerých těkavých mastných kyselin v krvi krav a denního množství nadojeného mléka na průběhu laktace.

V. Statistické zpracování jednotlivých rozdílů glykémie a hladiny veškerých těkavých mastných kyselin v krvi

	Rozdíl $\pm \bar{d}$ mg %	$\sigma \bar{d}$	t	Pravdě- podobnost P
Rozdíl glykémie v 63. a 91. dnu stáří telat	-22,2	6,9	3,2	0,05
Rozdíl hladiny těkavých mastných kyselin v 7. a 42. dnu stáří telat	-3,0	1,4	2,1	0,10
Rozdíl hladiny těkavých mastných kyselin v 63. a 126. dnu stáří telat	+4,6	1,1	4,2	0,01
Rozdíl glykémie v 30. a 120. dnu laktace u krav ve VÚŽV - Uhřetěves	+7,6	2,1	3,6	0,05
Rozdíl glykémie mezi v. jugularis a v. abdominalis externa u krav ve VÚŽV - Viglaš	-14,7	1,4	10,5	0,005

Rozdíl $\pm \bar{d}$ = rozdíl mezi průměrnou hodnotou, naměřenou na konci a na začátku příslušného pokusného období.

$\sigma \bar{d}$ = směrodatná odchylka rozdílu mezi průměrnou hodnotou naměřenou na konci a na začátku příslušného pokusného období.

t = hustota pravděpodobnosti tzv. Studentova rozdělení.

P = pravděpodobnost vyjádřená v %. Za statisticky průkazné považujeme případy, ve kterých hodnota P je alespoň 0,05 nebo menší.

a žilnou krví odebranou z *vena jugularis*. Tato stanovení jsme provedli ve VÚŽV Víglas na 11 tříletých kravách v I. laktaci. Absolutní hodnoty glykémie u jednotlivých krav v žilné krvi z *vena abdominis externy* a z *vena jugularis* včetně rozdílu v procentech jsou uvedeny v tabulce IV. Jednotlivé rozdíly v hladině glykémie a veškerých těkavých mastných kyselin v krvi telat a krav zařazených do pokusu jsou variačně statisticky zpracovány v tabulce V podle Studentova rozdělení „t“ (Jan ko, 1958).

Diskuse

Pokles glykémie v průběhu prvních tří měsíců stáří telat plně potvrdil výsledky pokusů Mc Carthy o (1956). Malý náhlý pokles glykémie mezi 60. až 90. dnem stáří telat (graf 1) spadá do údobí, kdy v krvi začíná stoupat hladina těkavých mastných kyselin, tedy do údobí, kdy organismus telat začíná využívat objemná krmiva. Tento jev, který našel i McCarthy, potvrzuje poněkud předpoklad Jacobsona a spol. (1951), který spojuje tento pokles glykémie s přechodem telat z mléčné výživy na výživu objemnou píci.

Zajímavé je, že hladina těkavých mastných kyselin v krvi telat začíná zvolna stoupat teprve v průběhu 3. měsíce a konečné výše, která odpovídá hladině těkavých mastných kyselin v krvi u dospělých zvířat, dosáhne až koncem 4. měsíce, ačkoliv Lengemann (1955) a Šalová a Ottová (1960) uvádějí, že již začátkem 2. měsíce je bachorová mikroflóra schopna trávit celulózu. Na tuto nesrovnalost narazil již Mc Carthy (1956), který zjistil, že hladina těkavých mastných kyselin v krvi se značně opožduje za stoupáním koncentrace těkavých mastných kyselin v bachoru. Zřejmě tedy existuje časový rozdíl mezi počátkem schopnosti bachorové mikroflóry zkvašovat celulózu a mezi počátkem schopnosti organismu využívat těkavé mastné kyseliny. V tomto směru bude třeba naše znalosti prohloubit, protože otázka stanovení nejvhodnějšího věku telat pro zařazení objemné píce do krmných dávek je velmi důležitá nejen biologicky, ale také ekonomicky.

Poněkud vysoká hladina těkavých mastných kyselin v prvním týdnu života telat a její pokles v průběhu prvního měsíce je pravděpodobně ovlivněn zpočátku vysokými a postupně se snižujícími dávkami plnotučného mléka. Tento předpoklad by podporovala práce Allen a spol. (1956), který zjistil, že koncentrace a složení mastných kyselin a tuků v krvi telat závisela na dietě, která obsahovala různé druhy tuků.

V průběhu pokusu na šesti tříletých laktujících kravách jsme nezjistili žádné podstatné změny v koncentraci veškerých těkavých mastných kyselin v krvi. Nápadná je pouze široká individuální variabilita hodnot těkavých mastných kyselin u jednotlivých krav na rozdíl od glykémie, která byla stabilnější. To znovu potvrzuje skutečnost, že koncentrace těkavých mastných kyselin v krvi přímo závisí na úrovni fermentace v bachoru (Reid, 1951a). Protože odběry krve byly řízeny podle data otelení a nebyly prováděny u všech krav tentýž den, mohla se ve variabilitě hladiny těkavých mastných kyselin v krvi kromě individuální funkční schopnosti bachoru uplatnit i variabilita v krmných dávkách.

Naproti tomu glukóza, která se teprve dodatečně syntetizuje z těkavých mastných kyselin v játrech, nepodléhá bezprostředním změnám ve výživě. Důkazem toho je práce Reidova (1950b), který zjistil, že glykémii u ovcí nelze ovlivnit ani krmním, ani vlivem prostředí, ani hladověním v délce 24 hodin.

Nízkou hladinu glykémie v prvních dvou měsících laktace a její stoupnutí v 3. a 4. měsíci můžeme dobře zdůvodnit úrovní mléčné produkce, která v prů-

běhu laktace postupně klesá. Zjištěná vzájemná nepřímá závislost glykémie na množství nadojeného mléka nás upozorňuje na nezbytnost glukózy pro zdárný průběh laktace. Na zásadní význam glukózy pro syntézu mléka v mléčné žláze poukazují i zjištěné rozdíly v glykémii mezi žilnou krví odtékající z vemene a žilnou krví jugulární.

Snížení glykémie v žilné krvi odtékající z vemene proti žilné krvi z *veny jugularis* dosahovalo v průměru 28,9 % (tabulka IV). Tyto rozdíly byly již také popsány Nikitinem (1949).

Protože dospělí přežvýkavci glukózu v zažívacím traktu nevstřebávají, ale všechny uhlohydráty zkvašují na těkavé mastné kyseliny, jak potvrzují údaje Annisona (1954), Azimova (1954) a Belascoa (1956), zdůrazňují naše výsledky význam glukoneogenéze, kterou bude třeba z hlediska syntézy mléka studovat jako jednu z nejpřednějších otázek dané tematiky.

Souhrn

Na šesti červenostrakatých telatech byla sledována závislost glykémie a hladiny veškerých těkavých mastných kyselin v krvi ve věku od sedmi dnů do šesti měsíců stáří. Bylo znovu potvrzeno, že glykémie s věkem postupně klesá a že koncentrace těkavých mastných kyselin v krvi stoupá, avšak vzhledem k poklesu glykémie s určitým zpožděním. Konečná výše glykémie i hladiny těkavých mastných kyselin, která odpovídá hodnotám dospělého skotu, se v krvi telat ustálí koncem 4. měsíce stáří.

Na šesti červenostrakatých kravách v I. laktaci ve stáří tři let bylo zjištěno, že průběh laktace neovlivňuje koncentraci veškerých těkavých mastných kyselin v krvi, která je závislá spíše na úrovni fermentace v bachoru. Naproti tomu glykémie během 3. a 4. měsíce laktace stoupá. Vzájemná závislost stoupání glykémie a současného poklesu množství nadojeného mléka upozorňuje na zásadní význam glukoneogenéze v játrech pro syntézu mléka. Tato skutečnost byla potvrzena i na 11 tříletých kravách v I. laktaci zjištěnými rozdíly glykémie mezi žilnou krví z *vena abdominis externy* a krví z *vena jugularis*.

Literatura

Allen R. S. a spol.: The effect of various dietary lipides on the blood plasma polyunsaturated fatty acids of dairy calves. J. Dairy Sci., 39, 1161, 1956. — Annison E. F.: The metabolism of short chain fatty acids in the sheep. Bioch. Jour., 57, 685, 1954. — Azimov G. J. a spol.: Fiziologija sel'skochozjajstvennych životnych. Moskva, 1954. — Bartoš S. a spol.: Metoda stanovení veškerých těkavých mastných kyselin v krvi skotu. Sborník ČSAZV, 1960; v tisku. — Belasco I. J.: The role of carbohydrates in urea utilization, cellulose digestion and fatty acids formation. J. Animal Sci., No 2, 496, 1956. — Conrad H. R. a spol.: The effect of rumen inoculation on the digestibility of roughages in young dairy calves. J. Dairy Sci., 33, 585, 1950. — Craine E. M. a spol.: The short-chain fatty acids of the peripheral blood of goats. J. Dairy Sci., 35, 631, 1952. — Crecelius-Seifert: Ein neues Blutzuckercolorimeter nach Crecelius-Seifert. Münch. mediz. Wochenschr., 75, 1301, 1928. — Hibbs J. W. a spol.: Changes in the blood sugar levels and volatile fatty acids content of rumen juice in calves raised on the high roughage system. J. Animal Sci., 11, 764m 1952. — Hodgson R. E. a spol.: Factors influencing the blood-sugar level of dairy cattle. J. Agr. Research, 44, 375, 1932. — Jacobson N. L. a spol.: The effects of various feeding systems on growth and certain blood constituents of dairy calves. J. Animal Sci., 10, 1050, 1951. — Janko J.: Statistické tabulky. Praha 1958. — Lambert M. R. a spol.: The relation of growth, feed consumption and certain blood constituents to changes in the dietary of young dairy calves. J.

Dairy Sci., 38, 6, 1955. — Lengemann F. W.: The development of rumen function in the dairy calf. J. Dairy Sci. 38, 651, 1955. — McCandles E. L. a spol.: A physiological change in intermediary metabolism of various species of ruminants incident to fundamental development of the rumen. A. J. Physiol. 162, 434, 1950. — McCarthy R. D. a spol.: Relation between age of calf, blood glucose, blood and rumen levels of volatile fatty acids, and in vitro cellulose digestion. J. Dairy Sci. 39, 1280, 1956. — McClymont G. L.: Identification of the volatile fatty acids in the peripheral blood and rumen of cattle and the blood of the species. Australian J. Agr. Research 2, 92, 1951. — Murley W. R. a spol.: The effects of aureomycin supplementation on growth and feed utilization of young dairy calves. J. Dairy Sci., 35, 846, 1952. — Nikitin V. N.: Novyje dannye po biochimii laktacii. Biochimija, 3, 211, 1949. — Reid R. L.: Utilization of acetic and propionic acids in sheep. Nature, 165, 448, 1950a. — Reid R. L.: Studies on the carbohydrate metabolism of sheep. I. The range of blood-sugar values under several conditions. Australian J. Agr. Research, 1, 182, 1950b. — Reid R. L. a spol.: The carbohydrate metabolism of sheep. II. The uptake by the tissues of glucose and acetic acid from the peripheral circulation. Australian J. Agr. Research 1, 338, 1950c. — Šálová J., Ottová L.: Studium nejvhodnějšího stáří telat k zařazení objemných krmiv se zřetelem na jejich stravitelnost a fermentaci celulosy in vitro. (I. Letní krmné období.) Věd. práce Výzk. úst. živ. výr. ČSAZV v Uhřetěvsi, 1960 (v tisku).

К вопросу изучения изменений гликемии и содержания летучих жирных кислот в крови красноспотного крупного рогатого скота

У 6 красноспотных телят в возрасте от 7 дней до 6 месяцев изучалась зависимость гликемии в крови и уровень всех летучих жирных кислот. Было подтверждено, что гликемия с возрастом постепенно снижается и что концентрация летучих жирных кислот в крови повышается, однако, по отношению к снижению гликемии, с определенным опозданием. Конечная высота гликемии и уровня летучих жирных кислот, которая соответствует величинам взрослого крупного рогатого скота, в крови телят в конце 4-месячного возраста становится постоянной.

У 6 красноспотных коров в I лактации в возрасте трех лет было установлено, что процесс лактации не оказывает влияния на концентрацию всех летучих жирных кислот в крови, которая зависит в большей мере от уровня ферментации в рубце. Наоборот, гликемия в течение 3 и 4 месяцев лактации — повышается. Взаимосвязь повышения гликемии и одновременного снижения количества надоев молока доказывает основное значение глюконеогенеза в печени для синтеза молока. Этот факт подтвердился и у 11 трехлетних коров в I лактации полученными разностями гликемии между венозной кровью и кровью из вены abdominis externae, а также кровью из вены jugularis.

A Contribution to the Knowledge of Changes of Glycaemia and the Content of Volatile Fat Acids in the Blood of Red Spotted Cattle

On 6 red spotted calves, 7 days till 6 months of age, the dependence of glycaemia on the level of all volatile fat acids in the blood was studied. Again it could be confirmed, that the glycaemia successively decreases with the age and that the concentration of the volatile fat acids in the blood increases, but in relation to the decrease of glycaemia with a certain delay. The final value of glycaemia and of the volatile fat acid level, corresponding with the values in adult cattle, is attained at the end of the fourth month of age.

On 6 red spotted cows in the first lactation, 3 years old, it was ascertained, that the course of the lactation does not influence the concentration of all volatile fat acids in the blood, which depends rather on the level of the rumen fermentation. On the other hand the glycaemia increases during the third and fourth month of the lactation. The mutual dependence of the increase of glycaemia on the simultaneous decrease of the milk quantity is a sign of the fundamental importance of the gluconeogenesis in the liver for the synthesis of the milk. This fact was also confirmed on 11 three years old cows in the first lactation by establishing the glycaemia differences of arterial blood and the blood of the vena abdominalis externa and vena jugularis.

Úloha kyseliny octové a propionové při syntéze glykogenu v játrech skotu

Роль уксусной и пропионовой кислот при синтезе гликогена в печени
крупного рогатого скота

The Role of the Acetic and Propionic Acid in the Synthesis of Glycogene in the
Liver of Cattle

CSc inž. Stanislav BARTOŠ

Výzkumný ústav živočišné výroby ČSAZV v Uhřetěvsi

Došlo dne 26. II. 1960

Úvod

Studium glykoneogeneze z těkavých mastných kyselin v játrech skotu má důležitý praktický význam, protože glukóza je hlavním zdrojem pro syntézu laktózy (Baxter, 1956) a glycerinového podílu tuku (Rogers, 1956) v mléce. Zajištění dostatečné syntézy glukózy v játrech je tedy nezbytnou podmínkou vysoké mléčné užitkovosti dojníc.

Využíváním těkavých mastných kyselin u přežvýkavců se zabývala již řada autorů. Jarrett (1950) injikoval intravenózně ovci, která byla zbavena glykogenu florisinem, roztok octanu a zjistil stoupnutí ketolátek v moči. Na základě těchto výsledků dokazuje, že kyselina octová není glykoplstická, ale naopak ketoplastická. Masson (1951) na základě rozboru portální a arteriální krve ovce dokazuje, že veškerý propionát se zachycuje a metabolizuje v játrech. Pennington (1952) zjistil *in vitro* na jaterních řezech ovčí, že na rozdíl od kyseliny octové a máselné se z kyseliny propionové v játrech netvoří žádné ketolátky. Shaw (1956) a později Schultz (1958) zdůrazňují význam kyseliny propionové jako účinné glykoplstické látky při léčení ketózy u dojníc.

Závěry všech těchto autorů jsou však vesměs odvozeny nepřímou a přímým sledováním úlohy těkavých mastných kyselin při syntéze glykogenu v játrech skotu se dosud nikdo nezabýval. Hlavní příčina nepochybně spočívala v tom, že jaterní tkáň odmítá ve standardním Krebs-Ringerově roztoku glykogen syntetizovat. Teprve Hastingsovi a spol. (1952, 1955), kteří studovali syntézu glykogenu v játrech krys, se podařilo zjistit příčinu tohoto jevu. Jestliže totiž jaterní řezy inkubujeme ve standardním Krebs-Ringerově roztoku, intracelulární draslík se rychle vyměňuje

za extracelulární sodík. Syntézu glykogenu v játrech prokázal Hastings pouze tehdy, jestliže zvýšil koncentraci draselných jontů v inkubačním roztoku na hodnotu, která byla schopna udržet normální intracelulární koncentraci draslíku v jaterních řezech.

V této práci, která je prvním sdělením naší laboratoře o úloze těkavých mastných kyselin při syntéze glykogenu v játrech skotu, se zabýváme vzájemným vztahem kyseliny octové a propionové.

Experimentální část

Metoda

Syntéza glykogenu z kyseliny octové a propionové v játrech skotu byla sledována *in vitro* na jaterních řezech ve Warburgově přístroji.

Vzorky jater. — Játra byla odebírána na jatkách bezprostředně po poražení zvířete a ihned zchlazena v termosce, která obsahovala fyziologický roztok s vysokým obsahem draslíku, připravený podle Hastingse (viz níže), ve kterém byla část destilované vody nahrazena ledem. Po převezení do laboratoře byly z jater na ručním mikrotomu podle Stadie a Riggsa (1944) nařezány řezy o průměrné síle 0,4 mm, které byly opláchnuty ve fyziologickém roztoku podle Hastingse, osušeny filtračním papírem, zváženy na torzních vahách a přeneseny do Warburgových baniček, obsahujících po 3 ml inkubačního media. Do každé baňky bylo přidáno 400 až 500 mg řezů.

Doba od vyjmutí jater do přenesení do Warburgových baniček nepřesahovala v průměru 1 hodinu. Baničky byly umístěny do Warburgova přístroje a pod mírným přetlakem pneumoxydu inkubovány 60 minut.

Inkubační medium. — Jako základní inkubační medium jsme použili fyziologický roztok podle Hastingsa (1952), který obsahoval: $K^+ = 110$, $Mg^{++} = 20$, $Ca^{++} = 10$, $Cl^- = 130$, $HCO_3^- = 40$ milimolů/litr. V každém pokusu jsme vždy v jedné polovině Warburgových baniček nahradili 20 milimolů chloridu draselného 20 milimoly na litr octanu draselného a v druhé polovině baniček 20 milimoly na litr propionátu draselného. Takto připravené fyziologické roztoky byly 10 minut probublávány pneumoxydem, načež bylo jejich pH upraveno přesně na 7,5.

Po rozpipetování těchto roztoků po 3 ml do Warburgových baňek bylo do každé Warburgovy baňky obsahující octan draselný přidáno cca po 1 mikrocurie radioaktivního uhlíku C^{14} ve formě octanu, značeného na 2. uhlíku a do každé Warburgovy baňky obsahující propionát draselný bylo přidáno po cca 1 mikrocurie radioaktivního uhlíku C^{14} ve formě propionátu, značeného na 2. uhlíku.

Kontrola aktivity přidávaných radioaktivních roztoků. — Předpokladem pro správné hodnocení výsledků bylo, že jak v inkubačním mediu obsahujícím radioaktivní propionát, tak v inkubačním mediu obsahujícím radioaktivní octan, je stejná aktivita izotopu uhlíku C^{14} . Proto byly roztoky přidávaného radioaktivního octanu a propionátu kontrolovány následujícím způsobem:

Na filtračním papíru byly vytvořeny kovovou trubkou o vnitřním průměru 20 mm kroužky z rozehrátého parafinu. Do všech kroužků bylo nakápnuto po jedné kapce 1,5n KOH, aby bylo zaručeno, že radioaktivní roztoky acetátu a propionátu nebudou při sušení tékat, a kroužky byly vysušeny pod infralampou za mírného

proudění vzduchu. Po vysušení bylo do 5 kroužků přidáno po kapce radioaktivního roztoku octanu značeného na 2. uhlíku a do dalších 5 kroužků po kapce radioaktivního roztoku propionátu značeného na 2. uhlíku. Všechny kroužky byly znovu vysušeny pod infralampou za mírného proudění vzduchu. Při sušení byl filtrační papír umístěn na obrácené víčko Petriho misky tak, aby se plocha kroužku zespodu nikde nedotýkala. Tímto způsobem bylo zajištěno, že radioaktivita byla ve všech 10 vzorcích stejnoměrně rozložena po celé ploše kroužku a jednotlivé naměřené hodnoty mohly být navzájem dobře srovnány. Výsledky tohoto srovnávacího měření jsou uvedeny v tabulce I. Vezmeme-li naměřenou průměrnou aktivitu jedné kapky roztoku octanu za 100 %, vychází nám pro průměrnou aktivitu jedné kapky roztoku propionátu hodnota 113,4 %.

Izolace glykogenu. — Po skončené inkubaci byly jednotlivé jaterní řezy vyjmuty z Warburgových baněk, opláchnuty v Hastingsově fyziologickém roztoku a přeneseny do centrifugačních zkumavek, obsahujících po 1 ml 30 % KOH. Zkumavky byly poté umístěny na 2 hodiny do vroucí vodní lázně. Po 2 hodinách byly zkumavky z lázně vyjmuty a po ochlazení bylo do nich přidáno po 7 ml absolutního alkoholu, aby byl vysrážen glykogen. Zkumavky jsme nechali stát do druhého dne při laboratorní teplotě.

I. Aktivita roztoků octanu a propionátu značených uhlíkem C¹⁴

Octan 2 — C ¹⁴			Propionát 2 — C ¹⁴		
vzorek č.	impulsy/min.	%	vzorek č.	impulsy/min.	%
1	11.652		1	12.902	
2	10.543		2	12.039	
3	10.417		3	12.076	
4	10.440		4	11.669	
5	10.241		5	11.738	
Průměr	10.659	100	Průměr	12.085	113,4

II. Syntéza glykogenu z octanu a propionátu *in vitro* v játrech skotu

Zvíře č.	Pohlaví	Aktivita glykogenu syntetizovaného		% využívání propionátu proti octanu
		z octanu	z propionátu	
1	♀	19,3 imp./min.	42,3 imp./min.	219,2
2	♀	37,2 imp./min.	59,9 imp./min.	161,0
3	♀	29,9 imp./min.	61,5 imp./min.	205,7
4	♀	42,0 imp./min.	67,9 imp./min.	161,7
5	♂	46,0 imp./min.	75,0 imp./min.	163,0
6	♂	46,0 imp./min.	67,7 imp./min.	147,2
7	♂	46,9 imp./min.	77,3 imp./min.	164,8
8	♂	47,7 imp./min.	97,3 imp./min.	204,0
Průměr				178,3

Druhý den byl obsah zkumavek odstředěn, supernant odlit, sraženina rozpuštěna v 1 ml destilované vody a glykogen znovu vysrážen přidáním 7 ml absolutního alkoholu.

Poté byl vysrážený glykogen odfiltrován na rozebíracím filtračním zařízení přes hustý filtrační papír (modrá páska) a dobře promyt 86 % alkoholem. Odfiltrovaný glykogen, který na filtračním papíru tvořil kolečka o průměru 20 mm, byl upevněn do držáku z plexiskla a umístěn pod zvoncovou Geigermüllerovou trubicí se slidovým okénkem. Radioaktivita každého preparátu byla měřena 20 minut a druhý den znovu kontrolována.

Výsledky

Syntéza glykogenu z octanu a propionátu, značených radioaktivním uhlíkem C^{14} byla sledována na jaterních řezech čtyř krav a čtyř býků. Výsledky měření jsou uvedeny v tabulce II. Četnost impulsů glykogenu syntetizovaného v propionátu uvedená v tabulce je již upravena na základě výsledků kontrolního měření základních radioaktivních roztoků (tabulka I) podle vzorce:

$$A_s = \frac{A_n \cdot 100}{113,4}$$

A_s = skutečná aktivita glykogenu syntetizovaného z propionátu,
 A_n = naměřená aktivita glykogenu syntetizovaného v propionátu.

Z naměřených výsledků vyplývá, že játra skotu využívají pro syntézu glykogenu o 78,3 % více kyseliny propionové než octové. Tento rozdíl je statisticky vysoce významný (pravděpodobnost 0,005).

Diskuse

V počátku našeho studia syntézy glykogenu v játrech skotu jsme se snažili naše výsledky, získané pomocí tékavých mastných kyselin, značených radioaktivním uhlíkem C^{14} doplnit souběžným sledováním syntézy glykogenu klasickou metodou, tj. stanovením obsahu glykogenu v jaterních řezech před inkubací a po inkubaci ve Warburgově přístroji, a z rozdílu usuzovat na velikost syntézy. Při sledování syntézy glykogenu nemůžeme ovšem oddělit vlastní syntézu od jeho glykolýzy. Oba pochody probíhají v jaterní tkáni současně a závisí pouze na podmínkách prostředí, tj. na koncentraci substrátu, z kterého se glykogen tvoří, a dále na výchozí koncentraci samotného glykogenu v jaterních řezech před inkubací, zda převládne syntéza či glykolýza. Aby skutečně převládla syntéza nad glykolýzou, je především nezbytné, aby obsah glykogenu v játrech zvířete byl snížen hladověním na co možno nejnížší hodnotu. O tom jsme se přesvědčili v kontrolních pokusech, při sledování syntézy glykogenu z glukózy, na jaterních řezech krys. Syntézu glykogenu bylo možno prokázat pouze v tom případě, kdy výchozí koncentrace glykogenu v jaterní tkáni před inkubací ve Warburgově přístroji byla nižší než 100 mg %.

V játrech skotu, odebíraných na jatkách, však bohužel nacházíme příliš vysoký obsah glykogenu. U býků je tokolem 700 mg % a u krav 350 mg %. Snížit tento vysoký obsah glykogenu v játrech skotu hladověním je prakticky nemožné. Metoda radioaktivních izotopů představuje tedy jedinou dostupnou metodu,

кterou můžeme *in vitro* pro přímé studium syntézy glykogenu z těkavých mastných kyselin v játrech skotu použít.

Z našich výsledků, touto metodou dosažených, vyplývá, že játra skotu využívají pro syntézu glykogenu o 78,3 % více kyseliny propionové než kyseliny octové. Tento výsledek, který je statisticky vysoce významný, se plně shoduje s předpoklady Massona (1951), Penningtona (1952) a Shawa (1956). Tito autoři, jak bylo již uvedeno v úvodu, odvodili na základě řady nepřímých metod, že kyselina propionová je glykoplatická.

Naše výsledky, získané přímým sledováním syntézy glykogenu z kyseliny octové a propionové v jaterních řezech skotu však současně dokazují, že kyselina octová není vysloveně ketoplastická, ale může být pro syntézu glykogenu využívána. Tato metabolická cesta glukoneogeneze hraje jistě významnou úlohu u vysokoproduktivních dojnic, kde vysokou poptávku po glukóze není možno plně krýt syntézou glukózy pouze z kyseliny propionové.

Souhrn

Byla sledována syntéza glykogenu z kyseliny octové a propionové, značených radioaktivním uhlíkem C^{14} , *in vitro* na jaterních řezech krav a býků.

Z dosažených výsledků vyplývá, že játra skotu využívají pro syntézu glykogenu o 78,3 % více kyseliny propionové než kyseliny octové. Tento rozdíl je statisticky vysoce významný.

Literatura

Baxter C. F. a spol.: The blood precursors of lactose as studied with ^{14}C -labeled metabolites in intact dairy cows. *Biochim. Biophys. Acta* 21, 277, 1956. — Hastings A. B. a spol.: Carbohydrate metabolism in rat-liver slices. I. The effect of cations in the media. *J. Biol. Chem.* 194, 69, 1952. — Hastings A. B. a spol.: Effects of ions and hormones on carbohydrate metabolism. *Recent Progr. Hormon. Res.* 11, 381, 1955. — Jarrett I. G. a spol.: The metabolism of acetate in sheep after injection of phlorizin. *Austral. J. Exptl. Biol. Med. Sci.* 28, 595, 1950. — Masson M. J. a spol.: The absorption of acetate, propionate and butyrate from the rumen of sheep. *J. Physiol.* 113, 189, 1951. — Pennington R. J.: Metabolism of short-chain fatty acids in the sheep. I. Fatty acids utilization and ketone-body production by rumen epithelium and other tissues. *Biochem. J.* 51, 251, 1952. — Rogers T. A. a spol.: The biosynthesis of milk-fat in the intact cow. *Biochim. Biophys. Acta*, 22, 284, 1956. — Shaw J. C.: Ketosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.* 39, 402, 1956. — Schultz L. H.: Use of sodium propionate in the prevention of ketosis in dairy cattle. *J. Dairy Sci.*, 41, 160, 1958. — Stadie W. C. a Riggs B. C.: Microtome for the preparation of tissue slices for metabolic studies of surviving tissues. *J. Biol. Chem.* 154, 687, 1944.

Роль уксусной и пропионовой кислот при синтезе гликогена в печени крупного рогатого скота

Изучался синтез гликогена из уксусной и пропионовой кислот, меченных радиоактивным углеродом C^{14} , *in vitro* на срезах печени коров и быков.

Из полученных результатов вытекает, что в печени крупного рогатого скота для синтеза гликогена используется на 78,3 % больше пропионовой кислоты, чем уксусной. Эта разница в статистическом отношении высокозначительна.

The Role of the Acetic and Propionic Acid in the Synthesis of Glycogene in the Liver of Cattle

Studies of the glycogene synthesis from the acetic and propionic acid by means of radioactive carboneum C^{14} in vitro upon slices of livers from cows and bulls. From the results obtained it is evident, that the liver of cattle uses for the synthesis of glycogene 78,3 % more propionic acid than acetic acid. This difference is from the statistical point very considerable.

Metoda stanovení veškerých těkavých mastných kyselin v krvi skotu

**Метод определения всех летучих жирных кислот в крови крупного
рогатого скота**

Methode der Feststellung von gesamten flüchtigen Fettsäuren im Blute der Rinder

Inž. CSc Stanislav BARTOŠ, PhMr. Alena HATLEOVÁ, Eva HALAŠOVÁ
Výzkumný ústav živočišné výroby ČSAZV v Uhřetěvsi

Došlo dne 22. II. 1960

Úvod

Metoda stanovení těkavých mastných kyselin v krvi skotu, nehledě k jejich nepatrné koncentraci, je značně ztížena tím, že nemáme vhodnou chemickou reakci, která by dovolila jejich kolorimetrické stanovení a jsme proto zcela odkázáni na metody fyzikální, tj. především na destilaci vodní párou. Základem těchto analytických metod zůstává dnes již klasická metoda *Friedemannova* a *Brookova* (1938), tj. destilace vodní párou s následující redestilací. Tato metoda byla později upravena *McAnallym* (1944), který použil k srážení bílkovin přímo síranu hořečnatého. Obě tyto metody jsou však značně složité a pro sériovou práci se nehodí. Proto se *McClendon* (1944) pokusil vypracovat zjednodušenou metodu pro stanovení těkavých mastných kyselin v krvi, jejíž nevýhodou však je, že pracovní postup vyžaduje mnohem vyšší koncentraci těkavých mastných kyselin v 1 ml analyzovaného vzorku, než normálně v krvi skotu nacházíme. Toto platí podobně i pro kvalitativní a kvantitativní stanovení těkavých mastných kyselin pomocí papírové chromatografie podle *Reida* (1951).

Metoda stanovení veškerých těkavých mastných kyselin v krvi skotu, kterou dále popisujeme, využívá základních prvků metody *Friedemannovy* (1938) a je výsledkem našich dvouletých pracovních zkušeností. Tato modifikace při poměrně jednoduchosti stanovení zůstává dostatečně přesnou a plně se osvědčila při sériových analýzách v naší laboratoři.

Princip stanovení spočívá v oddestilování těkavých mastných kyselin vodní párou z krevního filtrátu po srážení bílkovin hydroxydem barnatým a síranem zinečnatým a následující titrací 0,01n ethylátem sodným na bromthymolovou modř. Veškeré těkavé mastné kyseliny jsou vyjadřovány jako kyselina octová,

protože jak bylo zjištěno Riedem (1951), McClymontem (1951) a Crainem a spol. (1951), tvoří kyselina octová 91 až 100 % (podle molů) obsahu veškerých těkavých mastných kyselin v krvi skotu.

A. Reagencie

1. Vyvařená destilovaná voda.

Destilovanou vodu je třeba vařit po dobu 1 hodiny. Uchovává se v láhvi se spodním tubusem pod uzávěrem 50 % roztoku NaOH. Z této vody připravujeme všechny potřebné roztoky.

2. Síran zinečnatý 5 %.

Rozpustíme bezvodý ZnSO_4 ve vyvařené destilované vodě a zfiltrujeme.

3. Hydroxyd barnatý 0,3n.

Připravujeme z vyvařené vody a filtrujeme. Správnou normalitu tohoto roztoku kontrolujeme titrací 0,1n HCl na methylčerveně. Faktor se má pohybovat v mezích 0,9 až 1,1.

4. Síran hořečnatý 80 % v 1,5n kyselině sírové.

Rozpustíme za tepla krystalický $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ v asi 1,5n H_2SO_4 . Před použitím je třeba roztok vždy zahřát na 40° ve vodní lázni a udržovat ho během práce na této teplotě, aby nevykrystaloval.

5. Ethylát sodný 0,01n.

K 10 ml roztoku 0,1 n NaOH přidáme 10 ml vyvařené destilované vody a doplníme do 100 ml 96 % ethylalkoholem. Faktor stanovíme titrací 2 ml roztoku 0,01n kyseliny šťavelové na bromthymolovou modř.

6. Bromthymolová modř.

Rozpustíme 0,1 g bromthymolové modři v 1,6 ml roztoku 0,01n NaOH a doplníme na 100 ml destilovanou vodou.

7. Kyselina octová 0,001n.

Nejprve připravíme 60 mg % roztok pipetováním 0,6 ml ledové kyseliny octové do 1000 ml odměrné baňky a doplníme vyvařenou destilovanou vodou po značku, čímž získáme asi 0,01 n kyselinou octovou. Tento roztok faktorujeme titrací 2 ml 0,01n ethylátu sodného na bromthymolovou modř. Z tohoto roztoku připravíme 0,001n kyselinu octovou pipetováním 50 ml do 500 ml odměrné baňky a doplněním po značku vyvařenou destilovanou vodou. Ve 100 ml tohoto roztoku je asi 6 mg kyseliny octové, což odpovídá průměrnému obsahu těkavých mastných kyselin ve stejném objemu krve skotu.

B. Postup práce

1. Srážení krve.

a) K 50 ml krve, učištěné nesrážlivou fluoridem sodným (0,3 g NaF na 50 ml krve), přidáme postupně 20 ml roztoku 5 % ZnSO_4 (A-2), 20 ml roztoku 0,3n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (A-3) a 25 ml vyvařené destilované vody. Po přidání každého činidla a destilované vody důkladně protřepeme. Po ukončení srážení odstředíme a supernant zfiltrujeme.

b) K 50 ml filtrátu přidáme 10 ml roztoku 0,3n $\text{Ba}(\text{OH})_2$ (A-3), zazátujeme (nejlépe zabroušenou zátkou) a necháme v chladu stát do druhého dne.

2. Příprava standardů a slepého vzorku.

a) Standard: místo krve pipetujeme 50 ml roztoku 0,001n kyseliny octové (A-7) a dále postupujeme jako při srážení krve (B-1-a, b). Takto připravený standard odpovídá koncentraci 6 mg CH_3COOH ve 100 ml, tj. hodnotě, kolem které normálně kolísá obsah těkavých mastných kyselin v krvi skotu.

b) Slepý vzorek: místo krve pipetujeme 50 ml vyvařeného destilované vody (A-1) a dále postupujeme jako při srážení krve (B-1-a, b).

3. Destilace.

a) Varnou baňku destilačního aparátu pro destilaci vodní párou podle Parnas—Wagnera naplníme vyvařenou destilovanou vodou (A-1) a začneme destilovat. Necháme nakapat asi 300 ml vody, aby se přístroj dobře pročistil.

b) Zastavíme přívod páry a z destilační baňky vypustíme zkondenzovanou vodu.

c) Vzorek upravený podle odstavce (B-1-b) zfiltrujeme a z filtrátu ihned napipetujeme 25 ml do destilační baňky Parnas—Wagnerova přístroje. Přidáme 10 ml roztoku 80% síranu hořečnatého v 1,5n kyselině sírové (A-4) a začneme destilovat.

d) Necháme nakapat přesně 100 ml destilátu. Pak destilaci přerušíme a destilát ztitrujeme podle odstavce (B-4-a).

Je výhodné pracovat na dvou destilačních přístrojích, takže každý vzorek můžeme současně stanovit dvakrát. Nejprve destilujeme slepý vzorek (B-2-b), pak standard (B-2-a), pak postupně všechny vzorky krve upravené podle odstavce (B-1-b) a nakonec opět standard (B-2-a).

4. Titrace.

a) Ke 100 ml destilátu (B-3-d) přidáme 0,5 ml bromthymolové modři a roztokem necháme 2 minuty probublávat vzduch zbavený CO_2 .

b) Pak titrujeme 0,01n ethylátem sodným za stálého probublávání až do modrého zabarvení, které vydrží nejméně 30 vteřin. K titraci použijeme mikroburetu podle Banga o obsahu 2 ml, jejíž zásobní nádržku opatříme uzávěrem z natronového vápna.

C. Výpočet

Abychom převedli veškeré těkavé mastné kyseliny obsažené ve vzorku do titrační baňky, bylo by třeba, abychom do předlohy nadestilovali více než 300 ml destilátu. Tím bychom však roztok v titrační baňce příliš zředili a titrace by se stala nepřesnou, protože změna barvy indikátoru by byla velmi neostrá a pohybovala by se v širokém rozmezí. Proto k titraci odebíráme pouze prvních 100 ml destilátu, ve kterém se nachází prakticky 70 % těkavých mastných kyselin, obsažených v původním vzorku, napipetovaném do destilační baňky. Podle našich pracovních výsledků (viz statistické zpracování výsledků) je tato hodnota velmi stálá. Tuto hodnotu nazýváme účinností destilace (U) a získáme ji vydělením skutečné potřeby 0,01n ethylátu sodného pro standardní roztok (B-2-a) teoretickou spotřebou, stanovenou výpočtem. Pro standard obsahující 0,001n kyselinu octovou, upravený podle odstavce (B-2-a) a destilovaný podle směrnic uvedených v odstavci (B-3-a, b), činí teoretická spotřeba 0,905 ml 0,01n ethylátu sodného.

Skutečnou spotřebu 0,01n ethylátu sodného pro jednotlivé vzorky a standardy zjistíme tím, že od příslušné spotřeby odečtené na byretě a vynásobené faktorem ethylátu sodného odečteme spotřebu zjištěnou pro slepý vzorek (B-2-b). Jeden ml ethylátu sodného odpovídá 0,6005 mg kyseliny octové. Konečný výpočet provedeme podle následujících vzorců:

$$\text{Účinnost destilace (U)} = \frac{(St - Sl) \cdot f_1}{9,05 \cdot f_2}$$

$$\text{Obsah těkavých mastných kyselin ve vzoru krve} = \frac{(V - Sl) \cdot f_1 \cdot 0,6005 \cdot 11,06}{U} \\ \text{(vyjádřený jako kyselina octová) v mg \%}$$

St = odečtená spotřeba pro standard

Sl = odečtená spotřeba pro slepý vzorek

V = odečtená spotřeba pro vzorek krve

f_1 = faktor ethylátu sodného 0,01n

f_2 = faktor kyseliny octové 0,01n

U = účinnost destilace

Největší péči musíme věnovat odstranění CO_2 ze vzorků obsahujících těkavé mastné kyseliny. Na jeho absolutní nepřítomnosti závisí zdar celé práce. Veškeré skleněné nádoby vyplachujeme před použitím dokonale vyvařenou destilovanou vodou.

Vzduch, který používáme k probublávání při titraci, zbavíme kysličníku uhličitého alespoň čtyřnásobným probubláváním roztokem 60% KOH a následujícím sušením přes bezvodý chlorid vápenatý. Obsah CO_2 v používaném vzduchu kontrolujeme i během práce takto: ke 100 ml vyvařené destilované vody v titrační baňce přidáme 0,5 ml bromthymolové modři. Je-li voda správně vyvařena, vytvoří se jasně modré zabarvení. Do titrační baňky lehce dýcháme a tím změníme původní zabarvení na modrozelené. Neobsahuje-li vzduch, používaný k probublávání, žádný CO_2 , změní se během dvouminutového probublávání barva opět na jasně modrou. V opačném případě musíme zkontrolovat jakost 60% KOH v pomývačkách.

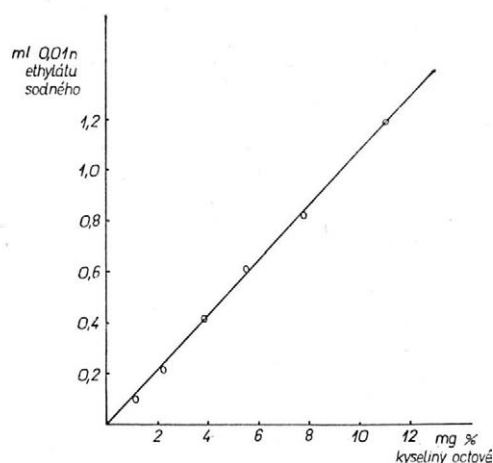
Statistické zpracování chyb výsledků

Přesnost uvedené metody stanovení obsahu těkavých mastných kyselin v krvi byla kontrolována analyzováním řady standardů, které obsahovaly 1,12 — 2,22 — 3,89 — 5,56 — 7,79 — 11,7 mg % kyseliny octové, tj. takové rozmezí koncentrací, v jakém normálně těkavé mastné kyseliny nacházíme v krvi skotu. U každé zvolené koncentrace bylo provedeno šest stanovení. Statistické zpracování výsledků bylo provedeno podle vzorce pro výpočet směrodatné odchylky při malém počtu případů, obvykle používaného v analytické chemii (Čůta, 1956): $s_w = K_w \cdot W$, kde „ s_w “ = směrodatná odchylka, „ K_w “ = faktor pro směrodatnou odchylku (v našem případě máme šest pokusných výsledků a tomu odpovídá $K_w = 40$) a „W“ = variační rozpětí, tj. rozdíl mezi nejvyšší a nejnížší hodnotou pokusně získaného výsledku. Všechny naměřené a vypočtené průměrné hodnoty pro jednotlivé koncentrace kyseliny octové v řadě standardů jsou uvedeny v tabulce I. Závislost nalezené spotřeby ethylátu sodného v ml na skutečném obsahu kyseliny octové v mg % v řadě standardů se stoupající koncentrací je znázorněna na grafu 1.

Z výsledků statistického zpracování je patrné, že takto modifikovaná metoda je spolehlivá a v rozmezí normálního obsahu těkavých mastných kyselin v krvi skotu, tj. v rozmezí 3 až 10 mg % CH_3COOH i dostatečně přesná, s maximální chybou výsledků $\pm 4,0$ %.

I. Statistické zpracování výsledků řady standardů se stoupající koncentrací kyseliny octové

Skutečná koncentrace CH_3COOH v mg%	Spotřeba ethylátu sodného v ml	Účinnost destilace	Nalezená koncentrace CH_3COOH v mg%	Směrodatná odchylka	Směrodatná odchylka v %
1,12	0,11	65%	1,12	$\pm 0,08$	$\pm 7,1$
2,22	0,22	65%	2,25	$\pm 0,24$	$\pm 10,7$
3,89	0,42	71%	3,93	$\pm 0,07$	$\pm 1,8$
5,56	0,61	73%	5,55	$\pm 0,22$	$\pm 4,0$
7,79	0,82	70%	7,78	$\pm 0,23$	$\pm 3,0$
11,70	1,18	70%	11,20	$\pm 0,23$	$\pm 2,1$



Graf 1. Závislost spotřeby ethylátu sodného v ml na stoupajícím obsahu kyseliny octové v mg% v řadě standardů.

Souhrn

Na základě dvouletých pracovních zkušeností v naší laboratoři byla vypracována zjednodušená modifikace metody T. E. Friedemanna a T. Brooka pro stanovení těkavých mastných kyselin v krvi skotu, která při poměrně jednoduchosti stanovení zůstává dostatečně přesnou a plně se osvědčila při sériových analýzách. Výsledky dosažené touto metodou byly statisticky ověřeny. Maximální chyba výsledků v rozmezí normální koncentrace těkavých mastných kyselin v krvi skotu (tj. 3 až 10 mg %) dosahuje $\pm 4,0$ %.

Literatura

Craine E. M. a spol.: The short-chain fatty acids of the peripheral blood of goats. J. Dairy Sci., 35, 631, 1952. — Čůta F.: Analytická chemie odměrná. Praha 1956. — Friedemann T. E., Brook T.: The identification and determination of volatile alcohols and acids. J. Biol. Chem., 123, 161, 1938. — McAnally R. A.: The determination of total volatile acids in blood. J. Exptl. Biol. 20, 130, 1944. — Mc

Clendon J. F.: Microdetermination of volatile fatty acids in blood. J. Biol. Chem. 154, 367, 1944. — McClymont G. L.: Identification of the volatile fatty acids in the peripheral blood and rumen of cattle and the blood of other species. Australian J. Agr. Research 2, 92, 1951. — Reid R. L.: Utilization of acetic and propionic acids in sheep. Nature 165, 448, 1950. — Reid R. L. a spol.: Separation and estimation of saturated C₂-C₇ fatty acids by paper-partition chromatography. Biochem. J. 50, 60, 1951.

Метод определения всех летучих жирных кислот в крови крупного рогатого скота

На основе двухлетнего рабочего опыта в нашей лаборатории была разработана упрощенная модификация Т. Е. Фриедеманна и Т. Бруока для определения летучих жирных кислот в крови крупного рогатого скота, которая при относительно простом определении остается достаточно точной и полностью себя оправдывает при серийных анализах. Результаты, полученные с помощью этого метода, были статистически достоверны. Максимальная ошибка результатов в границах нормальной концентрации летучих жирных кислот в крови крупного рогатого скота (т. е. 3 — 10 мг%) достигает $\pm 4,0 \%$.

Methode der Feststellung von gesamten flüchtigen Fettsäuren im Blute der Rinder

Auf Grund von langjährigen Arbeitserfahrungen in unserem Laboratorium wurde eine vereinfachte Modifikation T. E. Friedemann's und T. Brook's zur Feststellung von flüchtigen Fettsäuren im Blute der Rinder, welche bei einer verhältnismäßigen Einfachheit genügend präzise bleibt und bei Serienanalysen sich in vollem Maße bewährt hat. Die durch diese Methode erzielten Ergebnisse wurden statistisch überprüft. Der maximale Fehler der Resultate in der Spanne der normalen Konzentration der flüchtigen Fettsäuren im Blute der Rinder (d. h. 3 až 10 mg%) erreicht $\pm 4,0 \%$.

Teplotní charakteristika slezových proteáz telete

Температурная характеристика протеаз сычуга теленка

Temperaturcharakteristik der Kalblabmagenproteasen

Dr. Ant. JANČAŘÍK

*Pracoviště fyziologie výživy hospodářských zvířat, Výzkumný ústav krmivářský
ČSAZV Pohořelice, pracoviště Brno*

Došlo dne 13. XI. 1959

Úvod

Na našem pracovišti jsme se zabývali delší dobu problematikou digesce mléka u sajících telat. V tomto sdělení předkládáme výsledky té části výzkumu, která měla přispět k osvětlení průběhu trávení mléčných bílkovin ve slezu telete. V tomto směru bylo nejprve třeba rozřešit otázku, zda se při žaludečním trávení u telete uplatňuje i složka kathepsinová, jež kromě jiných vlastností se vyznačuje i určitou teplotní charakteristikou, jak je podrobněji uvedeno v následující stati.

Stručný přehled poznatků o enzymatickém trávení bílkovin v žaludku

Proust objevil v r. 1824, že v žaludeční šťávě je obsažena kyselina solná. V r. 1836 popsal Th. Schwann svůj objev proteolytického enzymu ze žaludeční sliznice — pepsinu. Sørensen (1909) pak prokázal, že pepsin pro svou maximální účinnost potřebuje velmi kyselé prostředí. U psa je pro pepsin optimální pH asi 1,0, u zdravého člověka 1,6.

Buchs při systematickém průzkumu koncentrace vodíkových iontů v žaludku kojenců zjistil v prvním roce pH 4,35 až 5,4 (viz podrobněji Jančařík, Prokšová, Reichl, 1957). Tato poměrně nízká kyselost žaludečního obsahu stejně jako poměrně vysoké pH ve slezu sajících telat, jež podle Keslera, Ronninga a Knodta (1951) se mezi 8. až 32. dnem věku pohybuje mezi pH 3,41 až 4,05 jsou vlastně velmi nepříznivé pro trávení pepsinem. Za tohoto stavu vědomostí je pochopitelné, že se dokonce vyskytly názory, že žaludek je k trávení bílkovin nezpůsobilý (Michaelis, 1914) nebo, že je jen reservoárem potravy (Demuth: Zur Physiologie der Milchverdauung im Säuglingsalter, 1926). K tomuto pojetí dodává Buchs zcela vtípně, že to má být určitá paralela s předžaludky přežvýkavců: bachor slouží jako reservoár a teprve ve žláznatém žaludku — slezu — se potrava rozkládá. Žaludek kojence, vybavený dokonalým mechanismem k vyměšování pepsinu, velmi účinné to proteázy, má vykonávat pouhou motorickou funkci bachoru!?

V tomto stavu zůstávala problematika žaludečního trávení až do let čtyřicátých tohoto století, kdy se začínají zabývat v dětské nemocnici prof. Freudenberg a v Basileji trávením mléka u kojenců. Odebírali dětem po snídani, sestávající z oslazeného čaje, žaludeční šťávu, měřili její aciditu (aktuální) a pomocí CaCO_3 upravili její pH na 5,5. Šťávu rozdělili na stejné porce a ke každé přidali pětinasobný objem odstředěného kravského mléka. Takto připravené vzorky upravili na různé pH a inkubovali v termostatu při 38°C . Po uplynutí jedné hodiny zjišťovali množství rozložených bílkovin. Výsledky jasně prokázaly, že bílkoviny mléka se rozkládají podle křivky, jež vykazuje dvě maxima: při pH 1,8 a při pH 4,7. Bílkoviny se tedy tráví nejen v pásmu pH 1,8, tj. v pásmu nejvyšší účinnosti pepsinu, ale i v pásmu kolem pH 5,0. To znamená, že mléko se může trávit velmi intenzívně brzy po skončení snídani a není třeba, aby kyselina solná nejprve pronikla veškerým obsahem žaludečním, aby se tak přiměřeně zvýšila koncentrace vodíkových iontů obsahu a teprve pak by mohlo dojít k trávení bílkovin v žaludku. Bod pH 4,7 zasluhuje si pozornosti také tím, že je to pH odpovídající izoelektrickému bodu kaseinu. V tomto bodě je totiž nejvyšší ústojná činnost kaseinu — a tím i mléka.

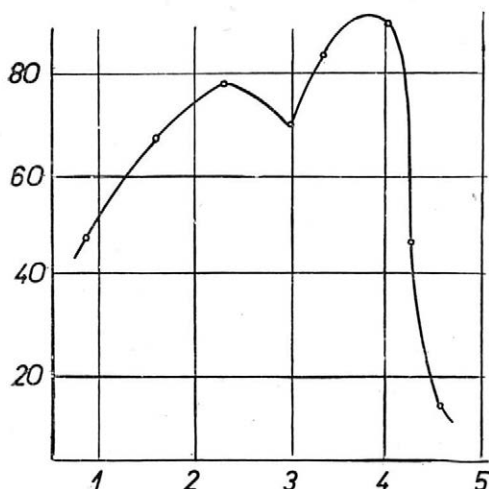


Diagram 1. Účinnostní křivka dětské žaludeční šťávy (tráveným substrátem byl edestin), vykazuje ve vztahu k pH (na abscise) dva vrcholy, z nichž jeden přísluší účinnosti pepsinové, druhý kathepsinové. Na ordinátě množství rozložených bílkovin (ex Buchs, 1954).

Buchs dále zjistil, že dvojevrcholová proteolytická účinnostní křivka žaludeční šťávy není příznačná jen pro mléko (případně kasein) jako substrát, nýbrž i pro jiné bílkovinné substráty, z nichž je především jmenovat edestin a hemoglobin. Ukázalo se, že křivka je stejná pro žaludeční šťávy kojenců i dospělých lidí a — jak prokazují zatím ojedinělé výzkumy — i pro mláďata a dospělé jedince jiných savců, dokonce i jiných tříd obratlovců. Tak pracemi Freudenbergovými a Buchsovými nastává nová epocha ve výzkumu trávicích enzymů, především proteáz, jež se projevuje jejich horlivým průzkumem.

Buchs prokázal, že trávicí činnost žaludeční šťávy v pásmu pH 3,5 až 5 vykazuje řadu vlastností odchylných od účinnosti pepsinu v pásmu kolem pH 1. Kromě zmíněného již optimálního pásma koncentrace vodíkových iontů je to především teplotní účinnostní optimum, jež je při pH 3,5 až 5,0 na úrovni kolem 68°C . V uvedeném pásmu pH se dá proteáza aktivovat kyanovodíkem a sírovodíkem a je značně rezistentnější proti některým pásmům elektromagnetického záření než pepsin. Proto Buchs zařadil tuto proteolytickou složku žaludeční šťávy do skupiny enzymů, popsaných Willstätterem pod názvem kathepsin. Willstätter popsal kathepsin jako intracelulární enzym obsažený ve všech živočišných buňkách, který se především uplatňuje v proteolytické fázi autolýzy. U bezobratlých byl považován za normální extracelulární digestivní enzym. Později se zjistilo, že kathepsin představuje vlastně komplex různých enzymových složek. Tak na příklad Bergmann (1942) rozeznává podle substrátové specifity, možnosti aktivace atd. čtyři kathepsiny (dokonce nejsou všechny ani proteasové povahy). Buchsem popsaný žaludeční kathepsin představuje fylogeneticky starší formu proteázy. Ve vztupné fylogenetické řadě však nepozbývá svého funkčního významu, spíše je do-

plňován mladší formou: pepsinem. Po funkční stránce vyplňuje kathepsin žaludeční šťávy svým účinnostním optimem při pH 3 až 5 mezeru mezi pepsinem (s optimem při pH 1,5 až 2) a parachymozinem (s optimem při pH 6), po případě i trypsinem (v duodenu, s optimem při pH 7 až 8). Posuzováno z hlediska prosté účelnosti, je tak zabezpečeno v žaludku trávení bílkovin při kterékoliv fyziologicky se vyskytující koncentraci vodikových iontů. Při tom největší podíl pochopitelně připadá kathepsinovému účinku, kdežto účinek pepsinu se uplatňuje teprve tehdy, když pH žaludečního obsahu klesne na úroveň jeho zóny působnosti.

Zvláště zajímavá a dnes často diskutovaná je otázka, zda v žaludku přítomná trojice proteolytických enzymů pepsin-kathepsin-parachymozin (poslednímu se především připisuje účinek syřidlový, tj. srážení kaseinu v mléku) představuje tři samostatné enzymy (chemická individua) nebo zda jde jen o různé projevy téhož enzymu za různých podmínek. V podstatě v tomto směru trvá rozkol mezi unitaristy a dualisty. Unitaristé, reprezentovaní Pavlovem a Parasčukem (1904) a Pekelharíngem (1905) poukazovali, že pepsin a parachymozin jsou vlastně též enzym. Dualistovi Hammarstenovi (1874) prokázali, že jím připravená čistá chymáza (= parachymozin v jiné terminologii) má pepsinovou účinnost. Když se podařilo Northropovi (1930) připravit krystalický pepsin a Berridgovi (1943) krystalickou chymázu (= parachymozin), zdálo se, že otázka je jednoznačně vyřešena ve prospěch hypotézy, že každý enzym představuje samostatné, chemicky přesně definované individuum. Avšak Buchs prokázal, že Northropův krystalický pepsin má i syřidlové účinky a Berridgova krystalická chymáza opět účinky pepsinové. Za dnešního stavu vědomostí se zdá být Buchsova unitaristická hypotéza pravděpodobnější.

V naší práci šlo o to, abychom objektivně zjistili, zda i u sajících telat se dá počítat při trávení se složkou kathepsinovou. Na tomto místě podáváme zprávu o našich výsledcích především pokud jde o teplotní charakteristiku proteázy žaludeční, neboť teplotní optimum kathepsinu je značně vyšší než u ostatních složek proteolytického žaludečního trávení.

Materiál a technika

Pro naše pokusy jsme používali extraktů sliznice slezu telat ve stadiu mléčné výživy (postkolostrální). Slezy jsme získávali na jatkách od telat, která netrpěla žádnou chorobou trávicího traktu. Pro přípravu extraktů byly vybírány jen ty slezy, jejichž obsahem byla jen žaludeční šťáva a sražené mléko. Po otevření slezu a po potenciometrickém zjištění koncentrace vodikových iontů obsahu slezu, byl slez vyprázdněn a vypláchnut fyziologickým roztokem. Nato byla sliznice slezu seškrábána, homogenizována a extrahována fosfátovým ústojným roztokem o pH 4,5. Extrakce byla prováděna tak, aby ve všech případech byl stejný váhový poměr extrahované sliznice a extrakčního činidla. Extrakce trvala 12 hodin při teplotě 0 až 2° C. Účinek extraktů byl určován tím způsobem, že k odměřenému množství nativního mléka (45 ml) o tučnosti 3,4 % (podle Gerbera), o obsahu bílkovin 4 %, jež bylo předtím na vodní lázni zahřáto na příslušnou teplotu (38, 50 nebo 60° C), a jehož pH z původní hodnoty 6,7 bylo přidávkem kyseliny solné upraveno na pH 4,5, bylo přidáno 2 ml extraktu slezové sliznice. Vzorky (kontrolní i pokusné) byly pak umístěny ve vodních lázních a ponechány zde jednu hodinu při příslušné teplotě, načež byly aktivní enzymy ve vzorcích rychle inaktivovány, bílkoviny vysráženy kyselinou sulfosalicylovou, tekutina ze vzorků několikerým promytím odfiltrována a ve zbytku byl zjištěn obsah dusíku podle Kjehldahla, a to jak ve vzorcích kontrolních, k nimž byl přidán inaktivovaný extrakt, tak i ve vzorcích pokusných. Obsah bílkovinného dusíku ve vzorcích kontrolních byl položen za rovný 100 %.

Výsledky a jejich diskuse

Výsledky jsou zachyceny v tabulce I. Při teplotě 38° C za uvedených podmínek je nejnižší průměrná proteolytická účinnost, tj. 27,6 %, při 50° C dochází ke zvýšené průměrné proteolytické účinnosti na 34,4 %, kteréžto zvýšení (vzhledem k účinnosti 38° C) je, jak je zřejmo z posledního řádku tabulky, vysoko statisticky průkazné ($P = 0,001$). Při 60° C je průměrná proteolytická účinnost nižší než při 50° C, ale vyšší (neprůkazně) než při 38° C. Rozdíl v účinnosti mezi 50° a 60° C je statisticky průkazný ($P = 0,01$). Ve všech skupinách pokusů podle jednotlivých teplot zjišťujeme poměrně vysokou variabilitu ($V =$

I.

	38° C	50° C	60° C
1.	38,5	46,9	28,9
2.	36,9	47,8	32,6
3.	31,5	32,5	28,2
4.	32,5	37,8	30,6
5.	26,1	49,8	37,6
6.	25,9	45,3	36,3
7.	25,9	22,1	24,6
8.	27,4	28,2	26,8
9.	32,5	25,3	28,0
10.	24,0	24,1	23,6
11.	22,6	23,4	23,5
12.	22,6	22,5	23,5
13.	22,8	21,2	33,7
14.	22,1	36,5	24,6
15.	19,9	38,4	24,9
16.	19,3	28,4	38,4
17.	28,4	35,6	33,5
18.	29,6	28,7	34,2
19.	30,2	45,4	38,5
20.	26,7	42,6	27,6
21.	28,1	33,9	28,2
22.	29,3	37,6	26,9
23.	31,5	38,6	28,1
24.	27,9	38,4	21,3
25.	28,4	29,5	29,5
n	25	25	25
M	27,6	34,4	29,3
s	4,8	8,9	6,3
s _m	0,96	1,78	1,26
V	17,4	25,9	21,5
t	38 : 50—3,40	50 : 60—2,34	38 : 60—1,08
P	38 : 50—0,001	50 : 60—0,01	—

Proteolytická účinnost extraktů slezů telat ve stadiu mléčné výživy při pH 4,5 a při teplotách 38° C, 50° C a 60° C, zkoušená na nativním kravském mléku a vyjádřená úbytkem bílkovinného dusíku (podle Kjeldahla) v procentech bílkovinného dusíku substrátu.

n = počet případů, M = průměrná hodnota, s = směrodatná odchylka průměru, V = variační koeficient (v m‰), s = směrodatná odchylka, t = Studentův test t pro průměry 38:50, 38:60, 50:60, P = pravděpodobnost vztahu 30:50, 38:60, 50:60.

17,4 %, 25,9 % a 21,5 %), což je pochopitelné, uvážíme-li, že substrátem bylo plné nativní mléko, tedy kompletní složitá biologická tekutina a nikoliv jen poměrně jednoduchá, chemicky definovaná látka (například edestin, hemoglobin, kasein atd.), jak tomu je při běžných analýzách biochemických. V tomto směru se liší naše práce od obvyklých prací v tomto směru, že substrátem je mléko, aby bylo možno všechny závěry převést přímo na jeho trávení. Od počátku této naší práce byli jsme si vědomi toho, že na tuto výhodu budeme doplácet značným rozptylem a nejednotností výsledků. Snažili jsme se tomu čelit pečlivostí v chemických analýzách, větším počtem pokusů a důkladnou základní variačně statistickou analýzou. Proto i v této tabulce dali jsme přednost jednostrannému Studentovu testu t před testy jinými.

Výsledky v tabulce I však ukazují přes všechny zmíněné již obtíže v naší práci, že při 50° C nastává významné zvýšení proteolytické účinnosti při pH 4,5, čímž je prokázáno, že i při trávení mléka v telecím slezu se uplatňuje složka kathepsinová, neboť v tomto teplotním pásmu při zmíněném pH nemohlo již nastat zvýšení účinnosti pepsinové. Důležitá je i ta skutečnost, že při 60° C zůstává při pH 4,5 proteolytická účinnost téměř na stejné výši jako při 38° C. Pepsinová účinnost by musila v této teplotní zóně vykazat již velký pokles. Tedy i průměr účinnosti dosažený při 60° C vylučuje účinek pepsinu. Nutno však také uvést i to, že ve smyslu klasických pokusů Buchsových měla být při 60° C vyšší účinnost než při 50° C. Tento rozdíl zatím vysvětlit nedovedeme, ale jako možné vysvětlení zůstává dále zmíněná již okolnost, že Buchs, Merten a ostatní pracovníci používali za substrát poměrně jednoduché bílkoviny a nikoliv kompletní nativní mléko (i s tukem), jak tomu bylo v našich pokusech, pokud nepřihlížíme k tomu, že zkoušeli žaludeční šťávu lidských novorozenců, kdežto my studujeme extrakty telecích slezů.

Tuto část můžeme uzavřít konstatováním, že naše pokusy, v nichž byla zkoušena proteolytická účinnost extraktů sliznice sajících telat za teplot 38°,

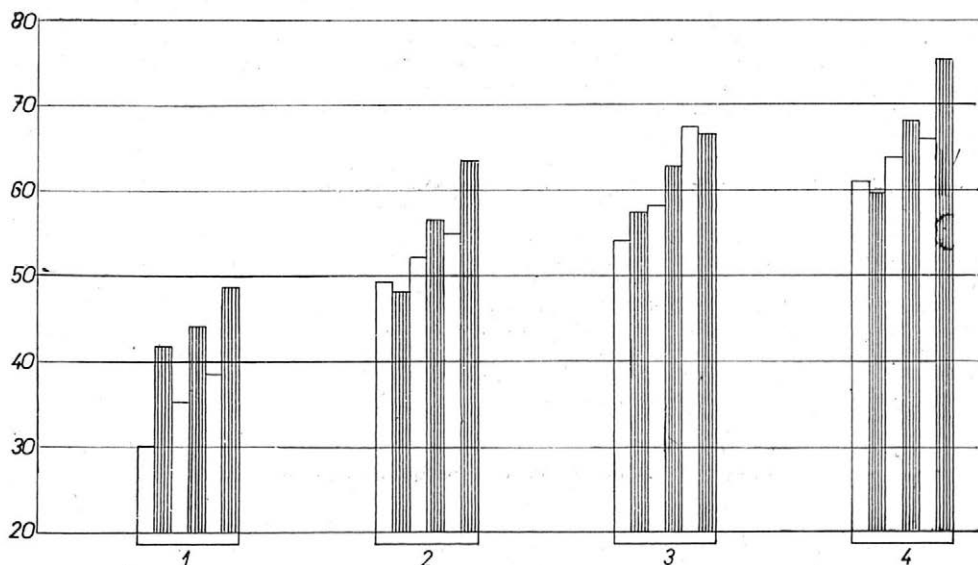


Diagram 2. Množství rozložených bílkovin (%) — ordináta) v nativním kravském mléku po přidání různého množství (1 až 4 ml — uvedeno na abscise) téhož extraktu sliznice telecího slezu při pH 4,0 za 1 hodinu. Prázdné sloupčky při teplotě 38° C, vyčárkované při 50° C.

50° a 60° C, jednoznačně prokazují, že v žaludeční části trávicího traktu telete musíme za fyziologických poměrů počítat se složkou kathepsinovou.

Tento poznatek není významný jen teoreticky, ale najde své uplatnění i v chovatelské praxi. Můžeme tvrdit, že bílkoviny mléka jsou tráveny tím rychleji, čím je mléko teplejší (ovšem ve fyziologických mezích) a že trávení mléka probíhá ve slezu telete od prvních okamžiků, kdy se dostalo do slezu, a nikoliv teprve až tehdy, až se všechno srazilo a pH obsahu slezu se upravilo na hladinou vhodnou pro trávení pepsinem, tj. pod pH 3,0. Tuto starou koncepci, která se dosud objevuje v učebnicích, můžeme dnes úplně zamítnout.

Souhrn

Proteolytická účinnost extraktů ze sliznice slezu sajících telat byla vyzkoušena při pH 4,5 a v teplotách 38°, 50° a 60° C. Jako substrátu bylo použito plného čerstvého kravského mléka. Nejvyšší proteolytická účinnost (34,4 % N proti kontrole) byla zjištěna při 50° C, o něco nižší (29,3 %) při 60° C a nejnižší (27,6 %) při 38° C. Tyto výsledky dovolují závěr, že ve slezu telete se uplatňuje při trávení bílkovin mléka také složka kathepsinová.

Literatura

1. Berridge, 1942: Nature (London), 40, 1942. — 2. Berridge, 1945: Bioch. Journ. 39, 179. — 3. Bersin, 1954: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie, Leipzig. — 4. Buchs, 1947: Die Biologie des Magenkathepsins, Basel. — 5. Buchs, 1954: Hoppe Seyl. Zeitschr. 296, 9. — 6. Buchs, 1954: Pflügers Arch. ges. Physiol. 324. — 7. Buchs, 1954: Zeitschr. f. Vitam. und Hormonforschung 6, 4/5, 245. — 8. Freudenberg, 1945: Schweiz. Med. Wochschr. 735. — 9. Freudenberg, 1946: Ann. Paed. 166, 77. — 10. Jančařík, 1954: Úvod do fyziologie trávení hospodářských zvířat, Praha. — 11. Jančařík, Prokšová a Reichl, 1957: Biologie výživy sajících mláďat, Praha. — 12. Northrop, Kunitz a Herriot, 1948: Crystalline Enzymes. — 13. Pawlow a Parastschuk, 1904: Hoppe Seyl. Zeitschr. 42, 415. — 14. Schwann, 1836: Arch. an. Physiol. und wiss. Med. 66. — 15. Hammarsten 1874: Malý's Jahrbichte 4, 135. — 16. Trendtel, 1931: Handbuch der Milch-wissenschaft.

Температурная характеристика протеаз сычуга теленка

Протеолитическое воздействие экстрактов из слизистой оболочки сычуга телят, питающихся материнским молоком, было проверено при pH 4,5 и температурах 38°, 50° и 60° C. В качестве субстрата применялось свежее цельное коровье молоко. Самое большое протеолитическое действие (30 % N по сравнению с контрольными опытами) было установлено при 50° C, немного меньшее (29,3 %) — при 60° C и самое низкое (27,6 %) — при 38° C. Эти результаты позволяют сделать заключение, что в сычуге теленка при переваривании белковых веществ молока свое действие проявляет также катепсиновый компонент.

Temperaturcharakteristik der Kalblabmagenproteasen

Die proteolytische Wirkung der Labmagenschleimhautextrakte von saugenden Kälbern wurde bei pH 4,5 und Temperaturen 38, 50 und 60° C untersucht. Als Substrat diente die frische volle Milch. Die höchste durchschnittliche eiweißspaltende Wirkung (34,4 % gegen die Kontrolle) wurde bei 50° C festgestellt, eine etwas niedrigere (29,3 %) bei 60° C und die niedrigste (27,6 %) bei 38° C. Diese Ergebnisse lassen den Schluß ziehen, daß sich die proteolytische Kathepsinwirkung im Kalblabmagen geltend macht.

Proteolytická účinnost elektroforetických frakcí extraktu sliznice slezu telete

**Протеолитическое действие электрофоретических фракций экстракта из слизистой
оболочки сычуга телят**

**Proteolytische Wirksamkeit einiger electrophoretischen Fraktionen des Schleim-
hautextraktes von Kalbmägen**

**Proteolytic Activity of Electrophoretic Fractions of the Mucous Membrane Extract of
Calf Maw**

Dr. Antonín JANČAŘÍK

*Výzkumný ústav krmivářský ČSAZV v Pohořelicích, pracoviště fyziologie výživy
hospodářských zvířat v Brně*

Došlo dne 23. XI. 1959

Úvod

Tato práce navazuje na předcházející práce Jančářík 1960 a, b, v nichž byla jednak podána teplotní charakteristika slezových proteáz, jednak byly zkoušeny trávící účinky elektroforetických frakcí syřidla. Ve druhé práci jsme se pokusili působením elektrického proudu oddělit od sebe jednotlivé proteolytické účinné složky v syřidle ve smyslu dualistické teorie a působení žaludečních proteáz (Hammarsten, 1874). Tento průkaz se nezdařil. Proto v další části našeho výzkumu jsme se pokusili působením elektrického proudu (elektroforézou) získat z čerstvého extraktu sliznice slezu sajících telat zvlášť frakci s účinností kathepsinovou a rozlišit pak obě podle teplotní proteolytické charakteristiky (viz Jančářík, 1960 a). Pokud jde o literární údaje o problematice žaludečních proteáz odkazujeme na práci Jančářík, 1960 a, a na knihu Jančářík - Prokšová - Reichl, 1957, str. 101 až 112.*)

Údaje o použitých technikách a materiálu doplňujeme jen, pokud nejsou obsaženy v citovaných již dvou pracích (Jančářík, 1960 a, b).

Dříve než jsme přistoupili k vlastní elektroforetické analýze extraktů ze sliznice slezu telat, provedli jsme předběžný pokus za účelem orientačního stanovení

*) Pokud jsou v této práci uvedeny literární údaje, vztahují se k seznamu literatury v práci Jančářík 1960a: Teplotní charakteristika slezových proteáz telete, Sborník ČSAZV - Živočišná výroba, v tomto čísle str. 863. Práce Jančářík 1960b: Elektroforetický výzkum syřidla ve vztahu k trávení vyšla ve Sborníku ČSAZV - Živočišná výroba, č. 8, str. 639—644.

difúzního toku proteolyticky účinné substance z extraktu. Princip tohoto stanovení vyplývá z následujícího příkladu (ex N a c h t i g a l: Technická fyzika, Praha 1952): Nasypeme-li do nádoby s vodou krystaly skalice modré, vytvoří se ve vrstvě, kam až sahají krystaly, za poměrně krátkou dobu nasycený roztok modré skalice, ostře oddělený od čisté vody nad ním. Roztok a čistá voda jsou sice v mechanické rovnováze, ne však v termodynamické rovnováze, jež vyžaduje, aby koncentrace roztoku byla v celé nádobě stejná. Po delším čase pozorujeme, že původní ostré rozhraní v zabarvení zmizelo a že roztok postupuje proti tíži výše a výše. Tento nezvratný děj se nazývá difúze; rozpuštěná látka proudí stále směrem koncentračního spádu. Podobný děj probíhá i v soustavě nádob pro elektroforézu, pokud jí neprobíhá elektrický proud. Za účelem zjištění tohoto difúzního toku dali jsme do střední nádoby (označené 3) extrakt ze slezu telete ve fosfátovém ústoji o pH 5,2. Ostatní nádoby byly naplněny čistým ústojem a spojeny v pořadí 1—2—3—4—5 trubičkovými můstky. Elektrický proud do soustavy zaveden nebyl. Takto zapojena byla ponechána celá soustava při laboratorní teplotě pro různé extrakty (viz tabulku I) 24 až 270 hodin. Po určitém časovém intervalu bylo spojení můstky zrušeno a z jednotlivých nádobek byly odebrány vzorky a zkoušeny na proteolytickou účinnost při pH 4,5 při jednodinové expozici při teplotě 38°, 50° nebo 60° C. Výsledky jsou v tabulce I. Z ní je zřejmo, že difúzi se substance s proteolytickým účinkem přemisťuje do dalších nádobek symetricky od středu, a to bez ohledu na to, zda jde o látku s proteolytickou účinností při 38°, 50° nebo 60° C, pokud bychom ovšem pro každou tuto účinnost předpokládali zvláštní substanci. Z tabulky je také zřejmo, že difúze substance se děje ve směru koncentračního spádu: ve zkumavce 3 (střední) je koncentrace nejvyšší a snižuje se na obě strany ke krajním zkumavkám 1 a 5.

Proteolytický účinek jsme sledovali takto: Do baněk o obsahu 150 ml bylo přidáno 45 ml kravského nativního mléka ohřátého na 40° C, jehož pH bylo přidáním N 0,25 kyseliny solné upraveno na pH 4,5. Do baněk bylo přidáno přesně odměřené množství zkoušené elektroforetické frakce nebo extraktu a vzorek byl hodinu inkubován v termostatu při příslušné teplotě, jak je uvedeno dále v textu nebo u tabulek, jež shrnují pokusné výsledky. Potom byly vzorky vyňaty z termostatu, rychle inaktivovány. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml 10% kyseliny sulfosalicylové a sraženina byla zachycena na filtračním papíře Schleicher a Schuell č. 5893, několikrát promyta vodou, načež i s filtračním papírem přenesena do spalovací Kjeldahlovy baňky a obvyklým způsobem byl zjištěn obsah dusíku. Obsah dusíku ve zkoušce kontrolní (tj. ve vzorku s přidáním inaktivovaným extraktem) byl položen na rovný 100 % a úbytek dusíku ve zkoušce s aktivní proteázou, tedy vlastní účinek proteázy, byl vyjadřován v procentech uvedeného základu.

V ý s l e d k y

Dříve než přistoupíme k rozboru údajů, jež jsme dostali z jednotlivých pokusů s elektroforetickými frakcemi, je třeba se stručně zmínit o výsledcích z tabulky I. Porovnejme mezi sebou proteolytické účinnosti v jednotlivých dvojicích teplot (38 : 50, 50 : 60, 38 : 60). Dostaneme takto teplotní indexy pro jednotlivé dvojice: I (38 : 50), I (38 : 60), a I 50 : 60). Při výpočtu těchto indexů postupujeme takto:

<u>I (38 : 50)</u>	<u>I (38 : 60)</u>
4,05 : 6,13 = 0,66	4,05 : 5,68 = 0,71
12,93 : 19,40 = 0,67	12,93 : 15,18 = 0,85
24,70 : 34,70 = 0,71	24,70 : 28,38 = 0,87
12,63 : 18,58 = 0,68	12,63 : 15,55 = 0,81
4,00 : 5,98 = 0,67	4,00 : 5,25 = 0,76
<u>součet = 3,39 : 5 = 0,68</u>	<u>součet = 4,00 : 5 = 0,80</u>

<u>I (50 : 60)</u>
6,13 : 5,68 = 1,08
19,40 : 15,18 = 1,28
34,70 : 28,38 = 1,22
18,58 : 15,55 = 1,19
5,98 : 5,25 = 1,14
<u>součet = 5,91 : 5 = 1,18</u>

Dostáváme tedy pro jednotlivé teplotní dvojice následující indexy:

$$I(38 : 50) = 0,68$$

$$I(38 : 60) = 0,80$$

$$I(50 : 60) = 1,18$$

Z práce Jančářík, 1960 a (z tabulky I této práce), vypočetli jsme indexy pro tytéž dvojice teploty:

$$I(38 : 50) = 0,80 \quad (= 27,6 : 34,4)$$

$$I(38 : 60) = 0,94 \quad (= 27,6 : 29,3)$$

$$I(50 : 60) = 1,17 \quad (= 34,4 : 29,3).$$

Tyto údaje týkají se totiž extraktů nepodrobených elektroforetickému dělení ani jakémukoli jinému fyzikálnímu nebo chemickému procesu. Tato čísla použijeme v dalším textu ke srovnání s výsledky z jednotlivých elektroforetických frakcí.

V tabulkách II, III a IV jsou zachyceny číselné výsledky pokusů, v nichž jsme sledovali proteolytickou účinnost jednotlivých elektroforetických frakcí extraktů žaludeční sliznice osmi různých telat (označených 1, 5, 6, 14, 15, 19, 20 a 24). Jednotlivé frakce jsou označeny +1 (tj. zkušavka s pozitivní elektrodou), +2, 3 (tj. zkušavka, do níž byl dán zkoušený extrakt), -4 a -5 tj. zkušavka, v níž byla záporná elektroda. Zkušavka +2 a -4 jsou spojovací mezi 3 a zkušavkami okrajovými. Ostatní technické detaily jsou podrobněji popsány v práci Jančářík, 1960 b. Z tabulek je zřejmo, že z čerstvých extraktů sliznice slezu jsme získali jedinou proteolytickou účinnou frakci, a to ve zkušavce 2, tedy stejně jako u syřidla (viz Jančářík, 1960 b). Tato frakce projevuje svůj proteolytický účinek při pH 4,5 a při teplotách 38°, 50° a 60° C, tedy jako skutečná složka kathepsinová.

V dalším uvádíme teplotní indexy I pro jednotlivé teplotní dvojice, a to pro frakci +2 a 3:

I (38 : 50) frakce +2 = 0,66 (= 12,35 : 18,70)

3 = 0,80 (= 20,98 : 26,21)

I (38 : 60) frakce +2 = 0,67 (= 12,35 : 18,48)

3 = 0,87 (= 20,98 : 24,09)

I (50 : 60) frakce +2 = 1,01 (= 18,70 : 18,48)

3 = 1,09 (= 26,21 : 24,09).

Čísla pro jednotlivé dvojice teplot jsou si tak blízké, že se dá předpokládat, že by mohly být výsledkem činnosti těže látky, a proto by mohly sloužit jako jeden z nepřímých dokladů pro unitaristickou teorii o žaludečních proteázách ve smyslu koncepce Pavlov - Paraščuk - Buchsovy.

I.

T	No	H	1	2	3	4	5
38° C	3.	24	2,0	6,1	20,7	4,9	1,2
	7.	135	4,6	14,2	28,3	13,8	4,3
	12.	260	6,8	21,2	32,7	22,0	7,3
	21.	270	2,8	10,2	16,3	9,8	3,2
	n		4	4	4	4	4
	M		4,05	12,93	24,50	12,63	4,0
50° C	s		2,1	6,4	7,4	7,2	2,5
	V		51,85	49,50	30,20	57,01	62,50
	3.	24	3,5	8,6	29,4	8,3	2,8
	7.	135	7,2	20,4	35,8	19,6	7,5
	12.	260	9,7	32,2	48,3	30,1	9,9
	21.	270	4,1	16,4	25,3	16,3	3,7
60° C	n		4	4	4	4	4
	M		6,13	19,40	34,70	18,58	5,98
	s		2,9	9,8	10,0	9,0	3,2
	V		47,30	50,52	28,81	48,44	29,17
	3.	24	2,5	5,8	26,2	6,2	2,2
	7.	135	6,7	11,3	29,6	15,1	6,4
60° C	12.	260	10,0	26,5	37,4	28,1	9,3
	21.	270	3,5	13,1	20,3	12,8	3,1
	n		4	4	4	4	4
	M		5,68	14,18	28,38	15,55	5,25
	s		3,4	8,8	7,1	9,2	3,2
	V		59,85	62,06	13,98	72,99	60,95

Proteolytická účinnost roztoků v jednotlivých frakčních nádobkách spojených můstky při nezapjatém elektrickém proudu. Do nádoby 3 byl dán extrakt ze sliznice slezu telete v ústoji o pH 5,02, v ostatních nádobkách, jež byly spolu v naznačeném pořadí spojeny můstky, byl čistý zmíněný fosfátový ústoj. Substrátem pro stanovení proteolytické účinnosti bylo nativní kravské mléko o obsahu tuku 3,4 % (stanoveno podle Gerbera). Proteolytická účinnost je vyjádřena úbytkem bílkovinného dusíku (zjišťováno podle Kjeldahla) v procentech dusíku substrátu (1=100 %). T — teplota, při níž byla zkoušena proteolytická účinnost; No — číslo telete; H — doba spojení nádobek můstky, vyjádřená v hod.; 1 až 5 — nádoby spojené můstky v uvedeném pořadí, n — počet měření, M — průměr proteolytické účinnosti, s — směrodatná odchylka, V — variační koeficient.

II.

No	HE	+1	+2	3	-4	-5
1.	22	0,0	11,9	30,0	1,0	0,0
5.	22	0,0	7,25	35,0	0,8	0,3
6.	72	0,6	26,3	12,6	1,7	0,2
14.	45	0,3	9,6	15,4	0,0	0,1
15.	22	0,0	9,2	21,8	1,4	0,6
19.	60	0,2	19,0	23,6	0,9	0,4
20.	45	0,6	8,5	19,0	2,1	0,3
24.	60	0,3	7,0	10,5	1,0	0,4
n		8	8	8	8	8
M		0,25	12,35	20,98	1,11	0,29
s		0,24	6,8	8,5	0,64	0,18
s _m		0,08	2,34	2,93	2,21	0,06
v		96,0	55,06	40,51	57,66	62,06

Proteolytická účinnost jednotlivých elektroforetických frakcí extraktů z telecích slezů zjišťovaná při teplotě 38⁰ C. Substrátem bylo nativní kravské mléko o obsahu tuku 3,4 % (stanoveno podle Gerbera). Účinnost je vyjádřena úbytkem bílkovinného dusíku (zjištěno podle Kjeldahla) v procentech dusíku substrátu v kontrole (=100 %).

No — číslo telete; HE — doba trvání elektroforezy v hodinách; +1 až -5 označení frakčních nádobek jak za sebou následovaly (v nádobce +1 byla +elektroda, do nádoby 3 byl dán extrakt sliznice telecího slezu s fosfátovým ústojem o pH 5,02, v nádobce -5 byla -elektroda); n — počet zjištění; M — střední hodnota proteolytické účinnosti; s — směrodatná odchylka; s_m — směrodatná odchylka od středu; v — variační koeficient.

III.

No	HE	+1	+2	3	-4	-5
1.	22	0,4	9,0	35,0	0,4	0,3
5.	22	0,0	14,2	42,7	2,1	1,1
6.	72	0,3	46,2	23,5	3,1	0,5
14.	45	0,7	16,0	22,0	0,4	0,1
15.	22	0,2	17,6	20,3	0,1	0,0
19.	60	0,1	26,2	24,6	0,6	0,3
20.	45	0,5	10,3	25,2	1,6	0,6
24.	60	0,7	9,7	16,4	0,8	0,3
n		8	8	8	8	8
M		0,33	18,70	26,21	1,06	0,40
s		0,3	12,4	8,5	1,10	0,36
s _m		0,10	4,28	2,93	0,38	0,12
v		90,90	66,31	32,43	103,77	90,00

Proteolytická účinnost jednotlivých elektroforetických frakcí extraktů z telecích slezů zjišťovaná při teplotě 50⁰ C.

Ostatní podmínky a zkratky stejné jako v tabulce II.

IV.

No	HE	+1	+2	3	-4	-5
1.	22	0,1	14,2	27,3	0,7	0,2
5.	22	0,3	15,2	31,2	1,0	0,5
6.	72	0,4	34,2	20,1	1,1	0,4
14.	45	0,2	18,2	21,3	0,3	0,1
15.	22	0,6	17,2	18,4	0,9	0,2
19.	60	0,5	30,4	36,2	0,6	0,4
20.	45	0,0	10,1	22,3	1,2	0,3
24.	60	0,0	8,4	15,9	0,0	0,1
n		8	8	8	8	8
M		0,26	18,48	24,09	0,73	0,28
s		0,23	9,2	6,9	0,42	0,14
s _m		0,079	3,17	2,38	0,14	0,048
v		88,46	49,78	28,64	57,53	50,0

Proteolytická účinnost jednotlivých elektroforetických frakcí extraktů z telecích slezů zjišťována při teplotě 60° C.

Ostatní podmínky a zkratky stejné jako v tabulce II.

Závěrem lze konstatovat, že je velmi pravděpodobné, že v žaludku (ve slezu) sajícího telete probíhá trávení bílkovin mléka v pásmu kathepsinové účinnosti. Působením elektrického proudu (elektroforetickým postupem) se nepodařilo oddělit od sebe látkové substance kathepsinové a pepsinové složky. Teplotní indexy proteolytické účinnosti různých dvojic teplot elektroforetických frakcí z extraktu žaludeční sliznice se neliší od teplotních indexů extraktů nepodrobených žádnému dělicímu pochodu. Tyto výsledky jsou podnětem k předpokladu, že různé typy proteolytické účinnosti (především kathepsinové a pepsinové) se dají připsat jediné proteolytické substanci, kterou zatím označujeme B u c h s o v ý m názvem: žaludeční proteáza.

Souhrn

V našich pokusech se nepodařilo působením elektrického proudu (elektroforetickým postupem) oddělit od sebe látkové substance pepsinové a kathepsinové účinnosti v extraktech ze sliznice slezu sajících telat. Teplotní indexy proteolytické účinnosti různých dvojic teplot substance z různých elektroforetických frakcí se neliší od teplotních indexů extraktů původních nepodrobených žádnému dělicímu pochodu. Tyto výsledky dávají možnost k závěru, že pepsinová i kathepsinová účinnost ve slezu telete jsou projevem jediné proteolytické substance, kterou zatím označujeme Buchsovým názvem: žaludeční proteáza.

Протеолитическое действие электрофоретических фракций экстракта из слизистой оболочки сычуга телят-сосуна

На основании полученных при наших опытах результатов, можно констатировать, что в желудке телят происходит переваривание белковых веществ в зоне действия катепсина. Это действие является выражением единственной активной субстанции, которая под влиянием разных внешних условий проявляется то действием пепсина, то катепсина. В наших опытах путем применения электрического тока (электрофоретическим приемом) не удалось друг от друга отличить вещества субстанции этих компонентов. Температурные индексы протеолитического действия разных температур той же субстанции различных фракций не отличались от температурных индексов первоначальных экстрактов, не подвергнутых никакому разделительному процессу. На основании этих результатов мы пришли к выводу, что различные типы протеолитического действия в экстрактах сычуга телят можно приписать единственной общей вещественной субстанции, нами пока обозначаемой наименованием БУХСА: желудочная протеаза.

Proteolytische Wirksamkeit einiger elektrophoretischen Fraktionen des Schleimhautextraktes von Kalbmägen

Aus unseren Versuchsergebnissen konnte festgestellt werden, daß im Kalbmagen eine Eiweißverdauung auch von Kathepsinnatur vor sich geht. Diese Wirksamkeit ist Äußerung der einzigen wirksamen Substanz, die bei verschiedenen Außenbedingungen (vor allem pH und Temperatur) einmal eine Pepsin-, andermal Kathepsinwirkung ausübt. Es gelang uns nicht durch Wirkung des elektrischen Stromes die Stoffsubstanzen der Wirkungsbestandteile voneinander zu trennen. Die Temperaturindexe der proteolytischen Wirkung verschiedener Temperaturenpaare von verschiedenen Fraktionen unterscheiden sich nicht von denen der ursprünglichen Extrakte, die keinem Teilungsprozeß unterworfen waren. Unsere Ergebnisse geben den Anlaß dazu, daß wir die verschiedenen Typen der proteolytischen Wirkung des Labmagenextraktes der Kälber der einzigen, beiden Wirkungen gemeinsamen Substanz zuschreiben, die wir vorläufig mit der Buchs'schen Bezeichnung Magenprotease benennen.

Proteolytic Activity of Electrophoretic Fractions of the Mucous Membrane Extract of Calf Maw

The author's research results demonstrate that the digestion of milk albumen in calf stomach (maw) is of cathepsin character. This fact is caused by a single active principle, which is, under various exterior conditions (especially pH and temperature) sometimes displayed by pepsin, at the other time by cathepsin or chymase activity.

The trials with the separation of cathepsin and pepsin components by means of electric current failed. There was no difference between the temperature indexes of proteolytic activity of various pairs of temperatures and those of electrophoretic fractions of the stomach mucous membrane extract, which were not submitted to any separating process. It may be therefore assumed that the various types of proteolytic activity (especially of cathepsin or pepsin character) are to be ascribed to a single proteolytic principle provisionally called by the Busch's term: the stomach protease.

Mohou se při trávení bílkovin mléka ve slezu telete uplatnit i rostlinné proteázy?

Могут ли растительные протеазы применяться при переваривании белков
молока в сычуге теленка?

Können sich auch die Pflanzenproteasen bei der Milcheiweißverdauung im Kalb-
labmagen geltend machen?

Dr. Ant. JANČAŘÍK

*Pracoviště fyziologie výživy hospodářských zvířat, Výzkumný ústav krmivářský
ČSAZV Pohořelice, pracoviště Brno*

Došlo dne 13. XI. 1959

Úvod

Otázka substituce trávicích enzymů našla v humánní medicíně příznivý ohlas a pozoruhodné výsledky. Perorální aplikace pepsinu i různých preparátů s digestivní účinností vyrobených z pankreatů (hlavně vepřových) je dnes velmi běžná téměř ve všech zemích světa. Používání těchto organopreparátů však vyžaduje, aby vnitřní prostředí (především pokud jde o pH) trávicích dutin organismu bylo upraveno tak, aby se tam mohla činnost podaného enzymu (máme na mysli především proteázy) rozvinout. Jde tu především o upravení kyselosti v dutině žaludeční. A právě v tomto bodě se naráží na četné překážky při používání živočišných proteáz. Nejčastěji je to samotná chorobná změna prostředí (například u achylických a subacidních stavů), jež zabraňuje rozvinutí činnosti endogenních proteáz organismu tím, že v žaludku není dostatek kyseliny solné k dosažení poměrně nízkého pH žaludečního obsahu, jež se běžně uvádí jako nutné pro rozvinutí peptického trávení. To se zvláště nápadně projevuje při používání potravy bohaté na bílkoviny, neboť štěpné produkty z bílkovin se vyznačují značnou ústojností. Tak například pro převedení 5% roztoku hydrolyzátu kaseinu na pH 1,2 (tj. na bod optimálního účinku pepsinu) bylo by třeba přidat 130 ml 12,5% kyseliny solné! Tato skutečnost sama o sobě nutí k hledání vhodné náhrady za živočišné proteolytické enzymy. Jde tu o proteolytické enzymy, které by byly účinné na nižší koncentrace vodíkových iontů, tj. při pH kolem 7,0. Tyto vlastnosti právě mají některé rostlinné proteázy. Jak Grassmann, Meyer a Waldschmidt - Leitz (1950) prokázali, vyznačují se některé rostlinné proteázy tím, že jedna rostlinná proteáza je s to nahradit účinek několika proteáz živočišných specializovaných na úzkou oblast pH (tak může například jedna rostlinná proteáza nahradit účinek pepsinu, trypsínu a

peptidas). Wallenfels poukázal na to, že jsou to především proteázy nižších hub, jež se vyznačují těmito vlastnostmi. V našich pokusech jsme obrátili svou pozornost k enzymovému přípravku Dymal, který byl připraven z plísňe druhu *Aspergillus orizae*. Kromě účinnosti proteolytické má tento preparát i účinnost amylolytickou a lipolytickou.

Metodika a materiál

Rostlinné proteázy

Americkým domorodcům (Indiánům) bylo už dávno známo, že šťáva z tak zvaného melounového stromu (*Carica papaya*) se vyznačuje tím, že maso v ní měkne — tráví se. Pro tuto svou vlastnost byla šťáva této rostliny mnohými badateli zkoumána a Wurtz a Bouchut (1879/88, ex Bersin, 1945) a von Vines, 1902/10 (ex Bersin), poznali, že obsahuje zvláštní proteolytický enzym — papain, který později Balls, Lineweaver a Thompson (1939) připravili v krystalické formě. Ze šťávy uvedené rostliny byl izolován ještě další proteolytický enzym — chymopapain. V roce 1945 (ex Bersin) izolovali Carpenter a Lovton další bílkoviny štěpící enzym asklepain z rostliny *Asclepias syriana* a Walti (ex Bersin, 1954) izoloval v roce 1938 ficin z jihoamerických druhů rostlin druhu *Ficus*. Tento poslední enzym nalezl své uplatnění především v medicíně, neboť rozkládal bílkoviny těl některých střevních cizopasníků, především *Trichuris trichiura* (tenkohlavec lidský), kteří, jak známo, odolávají účinku endogenních proteáz v trávicím traktu savců.

Smith, Worrel a Lilligren (1949 - ex Bersin) zjistili, že proteolytický enzym blízko příbuzný papainu je obsažen v mikrobech druhu *Proteus vulgaris* a *Bacillus subtilis*. Mikrobi i plísňe rozkládající bílkoviny jsou již dlouho známi, i když jejich proteolytické enzymy nejsou ještě dostatečně probádány.

V cizině se již delší dobu používá celé řady preparátů, které byly připraveny z nejrůznějších rostlin, především z plísní, s nimiž byly učiněny dobré zkušenosti u lidí trpících nedostatkem trávicích šťáv (aférmencie, achylie). Výhodou těchto preparátů je především to, že optimum jejich proteolytické účinnosti je značně posunuto k pH 7,0 (6,0 až 7,0) a proteolytická účinnost se udržuje až k pH 8,0. U nás se tyto preparáty dosud nevyrábějí. Laskavostí firmy C. F. Boehringer & Söhne G. m. b. H., Mannheim, dostal jsem dostatečné množství preparátu Dymal, jenž je vyroben z plísňe *Aspergillus oryzae* a obsahuje enzymy štěpící jak bílkoviny, tak i tuk (optimum při pH 6) i škrob (optimum při pH 5). Grassmann, Meyer a Waldschmidt-Leitz (1950) zjistili, že proteázy z rostlin štěpí bílkoviny nejen rychleji než živočišné proteázy z pankreatu, ale často i na jednodušší štěpné zplodiny. Pechmann (1951) ve své práci uvádí, že plísňové proteázy ve srovnání s papainem, s proteázami kvasinkovými a podobnými enzymy se vyznačují účinností v širším pásmu pH, že jsou odolnější proti oxydačním látkám i proti solím těžkých kovů, takže jsou mnohem přizpůsobivější v rozdílných poměrech trávicího traktu. Horowitz ve své disertaci (1951) zkoušel rostlinné preparáty Luizym, Arbuz, Gesenit a Dymal a zjistil, že právě Dymal je ze všech zkoušených preparátů proteolyticky nejúčinnější. Vykazoval také nejvyšší účinnost lipolytickou a celulo-lytickou. Pokud jde o účinek amylolytický, byl nejúčinnější Luizym. Autor zdůrazňuje, že plísňové enzymy svým účinnostním optimem od pH 5 do 8 vhodně

vyplňují mezery mezi žaludečními a střevními proteázami živočichů. Autor zdůrazňuje také dříve již zmíněnou skutečnost, že poměry v žaludku a ve střevě nejsou naprosto optimální pro působení pepsinu a trypsinu.

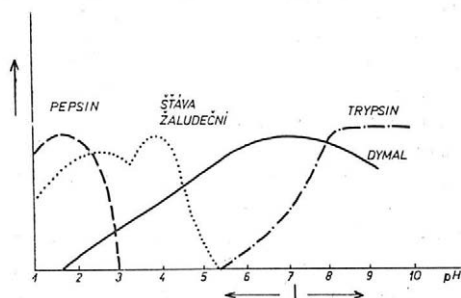


Diagram 1. Účinnostní křivky různých proteáz (ex Buchs: Biologie des Magenkathepsins, Basel 1947, doplněno údaji výrobce Dymalu.)

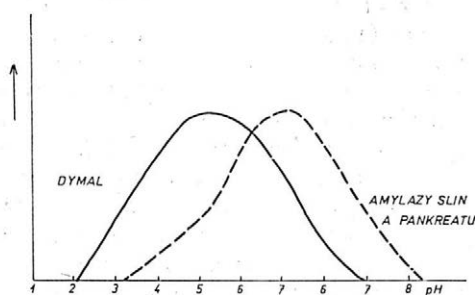


Diagram 2. Křivka amylolytického účinku Dymalu a amylas slin a pankreatu (účinek amyláz z práce Meyer, Fischer, Staub a Bernfeld 1948, *Helv. Chim. Acta* 31, 2158).

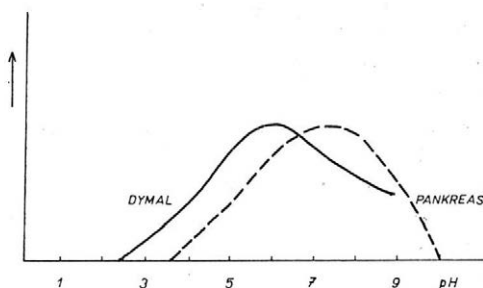


Diagram 3. Lipolytický účinek Dymalu a lipázy pankreatu (ex Frazer 1944).

V četných pracích se zaměřením klinickým se zdůrazňují příznivé výsledky, jichž bylo dosaženo používáním plísňových digestivních enzymů k ovlivnění trávicích pochodů pacientů trpících chorobami trávicích ústrojů.

V písemnictví nenacházíme vůbec žádnou zprávu o tom, že by bylo těchto preparátů použito u některých zvířat, především u zvířat hospodářských. V literatuře také postrádáme zpráv (až na výjimku uvedenou později v diskusi) o tom, že by byl sledován účinek plísňových enzymů společně s enzymy živočišného původu, především s těmi, s nimiž se plísňové enzymy při perorální aplikaci setkávají v trávicích dutinách. Pro problematiku našeho úkolu je důležité uvést i to, že dosud úplně chybějí údaje o tom, jak se plísňovými proteázami tráví bílkoviny mléka. Doplnit údaje v uvedených směrech, zvláště pokud jde o poměry u sajících telat, bylo rovněž našim výzkumným úkolem.

Naše pokusy s Dymalem byly zaměřeny především k tomu, abychom zjistili, zda je možno tyto preparáty použít u telat. Tím se liší naše výzkumy od všech ostatních, které byly s rostlinnými proteolytickými enzymy provedeny. Další zvláštností vyplývající z uvedené již podmínky našich pokusů bylo to, že jsme za substrát proteolytického trávení nepoužívali jako ostatní autoři látek uměle připravených (želatiny, kaseinu, hemoglobinu, edestinu apod.), ale nativního kravského mléka, tj. komplexní potravu telete ve stadiu mléčné (ale postkolostální) výživy. V našich pokusech jsme nezjišťovali jen proteolytickou účinnost samotného Dymalu, ale sledovali jsme i další dosud neřešenou otázku, jak probíhá

trávení bílkovin Dymalem a za přítomnosti syřidla nebo pepsinu, jako endogenních proteáz telecího slezu. Účelem této části našeho výzkumu bylo zjistit vzájemný vztah Dymalu a uvedených proteolytických substancí při trávení, neboť vyšetření těchto vztahů má základní důležitost pro případ, že bychom navrhli Dymal (nebo proteázy jemu podobné) k použití jako náhrady za chybějící slezové proteázy. Našími pokusy jsme chtěli zjistit nejen to, zda se Dymalem dá nahradit u telete chybějící žaludeční proteáza, ale i to, zda se Dymalu dá použít i ke zvýšení účinnosti slabě účinného vlastního endogenního proteolytického systému v žaludku mláďete. Zvláštní pozornosti si vyžadovalo i to, zda Dymal, i kdyby se ukázal funkčně naprosto vyhovující náhradou za endogenní žaludeční proteázu, nepůsobí na tuto proteázu rušivě. Z enzymologie totiž známe případy, kdy jedna proteáza (tj. enzym s proteolytickým účinkem) rozkládá bílkovinnou složku (tzv. apoenzym) jiné proteázy a tím tuto vylučuje z funkce. I při substituční léčbě musí se podobný zásah, jímž se některá složka organismu vylučuje z funkce, pečlivě rozvážit. Poněvadž perorální používání rostlinných proteáz pro sající mláďata je velmi jednoduchý zákrok, který se může velmi rozšířit do chovatelské praxe, věnovali jsme právě uvedeným možným námitkám velkou pozornost při řešení tohoto úkolu se zvláštním zřetelem k tomu, že jde o zásahy u velmi mladých zvířat, u nichž narušení digestivní funkce v jejich útlém věku by se mohlo nepříznivě odrazit ve věku pozdějším a nepříznivě zasáhnout i do jejich užítkovosti. V naší práci jsme také věnovali pozornost účinku jednotlivých proteolytických substancí na trávení mléka podle obsahu tuku.

Pokud jde o metodickou stránku pokusů popisovaných v této stati upozorňujeme, že všechny pokusy byly provedeny při pH 4,5, tj. za koncentrace vodíkových iontů, jež je v obsahu telecího slezu brzy po zahájení trávení a není optimální pro účinnost Dymalu. Expoziční teplota byla vždy 38° C. Proteolytickou účinnost hodnotíme podle množství rozložených bílkovin, jejichž množství určujeme jako rozdíl bílkovinného dusíku mezi zkouškami kontrolními (= 100 %) s inaktivovanými proteázami a zkouškami pokusnými. K účinkům syřidlovým nebylo přihlíženo.

Proteolytická účinnost pepsinu a syřidla

Pokusy, jejichž výsledky zde uvádím, mají být úvodem k částem následujícím. Chtěli jsme zjistit, jak se projevuje účinnost preparátů pepsinu a syřidla při trávení mléka o různém obsahu tuku při trávení mléka za té koncentrace vodíkových iontů (pH 4,5), která je v obsahu slezu telete velmi častá, při tom však vzdálená od zóny účinnosti pepsinu.

Tabulka I a diagram 4 znázorňují výsledky. Z nich je zřejmo, že preparát pepsinu tráví bílkoviny mléka i v uvedené oblasti pH, tj. projevuje typické kathepsinové účinky. Jeho účinnost se zvolna snižuje podle toho, jak se zvyšuje obsah tuku. Variační koeficient dat o účinnosti pepsinu není nikterak vysoký (15,27). Z téže tabulky a z téhož diagramu se dovídáme, že i samo syřidlo nejen mléko sraží, ale i jeho bílkoviny průkazně rozkládá.

Sloupec Pe+Sy v tabulce I a stejně označená křivka v diagramu vykazují vzhledem ke svým složkám naprosto přesvědčivě charakter součtový, tj. že společný účinek Pe a Sy se přibližuje součtu účinků samotných jednotlivých substancí. To znamená, že Pe a Sy nevystupují jako faktory proteolytické antagonistické, ale naopak jejich účinky se počítají. Z výsledků tohoto pokusu by se dalo usuzovat, že žaludeční proteázy pepsin-(kathepsin)-chymáza (= parachymosin) jsou jen různé projevy téže žaludeční proteázy, neboť právě o proteolytických enzimech

I. Proteolytická účinnost pepsinu (Pe) a syřidla (Sy) a jejich směsi 1:1 (Pe+Sy) zjišťovaná na nativním kravském mléce o různém obsahu tuku (%) za teploty 38° C při pH 4,5.

Účinek je vyjádřen v procentech rozložených bílkovinných ve vztahu ke kontrole (obsah bílkovin v kontrole = 100 %). n — počet zjištění, M — střední hodnota, s — směrodatná odchylka, sm — směrodatná odchylka středu, v — variační koeficient.

	%	Pe	Sy	Pe + Sy
	1,95	30,5	20,2	40,7
	1,95	33,1	18,2	49,7
	1,95	31,1	19,1	39,7
	1,95	30,4	14,9	36,6
	1,95	28,5	18,1	34,6
	1,95	26,6	18,5	40,5
	1,95	26,8	16,2	39,7
	1,95	30,5	14,6	35,8
	1,95	27,0	17,8	36,5
	1,95	29,3	18,8	38,2
	1,95	26,5	17,1	36,2
	2,5	30,2	24,3	40,2
	2,5	33,6	25,1	41,6
	2,5	28,7	18,6	38,4
	2,5	35,4	20,3	36,2
	3,4	23,6	16,8	33,1
	3,4	27,2	15,4	31,6
	3,4	25,1	17,2	34,4
	4,1	24,2	21,3	38,4
	4,1	26,2	20,8	31,4
	4,1	27,4	23,5	40,2
	5,3	21,6	16,3	36,2
	5,3	24,5	12,8	31,4
	5,5	18,2	14,5	36,2
	5,5	21,6	15,2	30,1
n	25	25	25	25
M	3,02	27,5	18,22	37,10
s	1,3	4,2	3,2	4,2
sm	0,26	0,84	0,64	0,84
v	43,04	15,27	17,56	11,32

je známo, jak jsme již dříve uvedli, že se ve směsi různých proteáz často rozkládá jeden enzym bílkovinnou podstatu enzymu druhého, čímž se celková účinnost snižuje. Poněvadž toto pravidlo není bez výjimek (viz později uvedenou souběžnost účinností Dy a Pe, případně Dy a Sy) nelze prostou integraci účinků považovat za úplný důkaz, má však jistě svůj význam ve spojení s důkazy dalšími; v tomto směru odkazuje na další naše práce (Sborník ČSAZV 1960, Ž. v. p. 863—875). Ve svých starších pracích, zaměřených jiným směrem (Jančařík, 1950 až 1958), jsem upozornil na nutnost sledovat účinky proteolytických enzymů různého původu, pokud se setkávají v trávicím traktu živočicha. Také problematika této práce vyžaduje sledování společného působení několika preparátů trávicích enzymů, hlavně pokud se tyto v trávicím traktu normálně nebo po perorální aplikaci mohou setkat.

Jak jsme již uvedli, není v celkové charakteristice křivek pepsinu a syřidla mezi oběma enzymy velkých rozdílů, ani křivka účinnosti jejich směsi nemá charakter odchýlný. Přesto však v dalších pokusech srovnáme účinnost Dymalu

vždy zvlášť s účinností syřidla a zvlášť s účinností pepsinu, jako bychom každou tuto substanci považovali za látku samostatnou a odlišnou od druhé.

Z uvedených našich výsledků vyplývá závěr, že přídavek jak syřidla, tak i pepsinu znamená zvýšení proteolýzy ve slezu, aniž by bylo potřeba přidávat

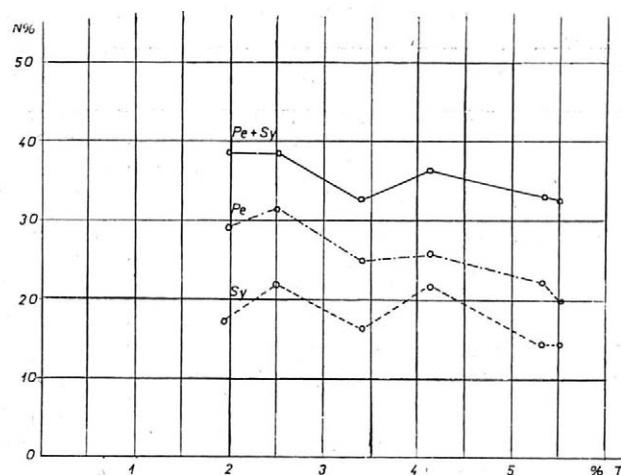


Diagram 4. Proteolytický účinek pepsinu (Pe), syřidla (Sy) a jejich směsi 1:1 (Pe+Sy) na nativním kravském mléku. Na abscise obsah tuku v %, na ordinátě množství rozložených bílkovin v % vzhledem ke kontrole.

II. Proteolytická účinnost Dymalu (Dy) a pepsinu a jejich směsi 1:1 (Dy+Pe) za stejných podmínek jako v tabulce I.

	%	Dy	Pe	Dy+Pe
	1,9	14,3	26,6	31,6
	1,9	13,4	26,9	35,6
	2,0	17,0	22,3	49,0
	2,0	15,8	20,6	39,9
	2,2	40,2	28,4	51,2
	2,2	38,6	31,2	43,4
	2,5	38,4	27,1	51,4
	2,8	40,1	24,2	55,2
	2,8	37,6	25,1	47,2
	3,4	18,6	26,2	42,8
	3,4	15,7	25,9	32,1
	3,7	24,6	29,6	43,5
	3,7	25,1	26,1	39,6
	3,7	28,4	24,6	41,6
	4,1	12,3	24,1	40,7
	4,3	14,1	20,2	35,6
	4,3	12,8	22,1	28,4
	4,3	13,6	27,2	31,2
	4,4	12,9	25,6	35,1
	4,4	10,7	16,7	53,3
	5,4	21,2	22,5	35,7
	5,4	25,0	19,1	43,8
	5,5	22,1	28,6	40,6
n	23	23	23	23
M	3,49	22,28	24,82	41,24
s	1,2	10,2	3,5	7,5
sm	0,25	2,13	0,73	1,56
v	34,38	45,78	14,10	18,19

III. Proteolytická účinnost Dymalu (Dy) a syřidla (Sy) a jejich směsi 1:1 (Dy+Sy) za stejných podmínek jako v tabulce I.

	%	Dy	Sy	Dy+Sy
	1,9	15,4	18,5	33,1
	1,9	14,5	19,7	32,4
	1,9	12,7	17,4	30,1
	1,9	15,6	18,7	33,5
	1,9	15,9	19,5	27,7
	1,9	14,9	11,4	33,2
	2,0	19,1	19,7	32,3
	2,0	15,7	18,2	33,2
	2,0	14,5	14,9	31,4
	2,0	13,5	12,2	30,4
	2,4	41,6	19,6	49,4
	2,4	43,2	25,8	53,0
	2,4	45,8	24,3	57,5
	3,0	13,5	23,6	33,0
	3,0	16,2	25,9	35,0
	3,2	9,4	20,1	19,2
	3,2	8,3	18,9	19,2
	3,2	11,3	22,9	17,2
	3,3	12,6	15,6	28,3
	3,3	12,6	14,6	26,3
	3,4	25,2	12,8	38,4
	3,4	30,2	14,8	36,1
	3,4	32,9	20,1	37,2
	3,5	26,0	10,1	29,6
	3,5	29,0	12,8	31,5
	3,5	29,0	12,5	32,3
	4,4	12,1	21,1	35,2
	4,4	10,8	20,4	36,6
	4,4	13,3	22,9	34,4
	5,5	30,1	12,4	49,1
	5,5	31,8	11,0	48,4
	5,5	24,7	10,3	40,8
n	32	32	32	32
M	3,10	20,67	17,59	34,53
s	1,1	10,4	4,7	9,2
s _m	0,19	1,82	0,82	1,61
v	35,48	50,31	26,72	26,64

kyselinu. Prokazuje se tedy, že perorální aplikace pepsinu nebo syřidla může zvýšit proteolýzu ve slezu i při pH 4,5. Tento zákrok je třeba vzít vždy v úvahu v těch případech, kdy se jím může zabránit hnilobné dyspepsii. Do hotového již rukopisu této práce připojuji poznámku o článku doc. dr. V. Kurze (Zemědělec 1960, 14, 12, 2), v němž uvádí své dobré výsledky s aplikací pepsinu a syřidla u telat na statku VŠZL v Žabčicích, kde předtím telata hynula na zhoubné průjmy.

Proteolytická účinnost Dymalu s pepsinem nebo syřidlem

Výsledky pokusů s Dymalem a pepsinem, případně i se syřidlem jsou zachyceny v tabulkách II a III a v diagramech 5 a 6.

Sledujeme-li v uvedených tabulkách a diagramech proteolytickou účinnost

samotného pepsinu nebo syřidla (v nichž jsou uvedeny výsledky jiných pokusů než v tabulce I), vidíme, že variační koeficient pepsinu je 14,10, u syřidla 26,72. Sumárně jsou výsledky zhodnoceny v tabulce IV. Z ní je zřejmo, že jedině samotný pepsin v tabulce I vykazuje statisticky významnou korelaci (negativní) s obsahem tuku v mléce, soubor Pe zpracovaný v tabulce II vykazuje rovněž negativní korelaci, jež však není statisticky signifikantní, avšak sumární korelace

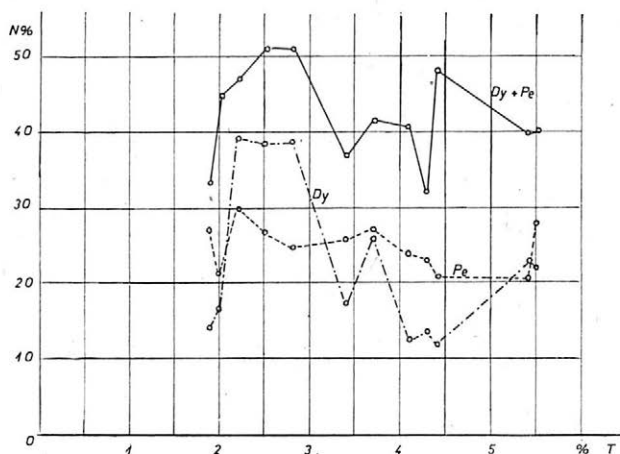


Diagram 5. Proteolytický účinek pepsinu (Pe) a Dymalu (Dy) a jejich směsi 1:1 na nativním kravském mléku. Na abscise obsah tuku v %, na ordinátě množství rozložených bílkovin v % vzhledem ke kontrole.

vypočtená z obou tabulek statisticky signifikantní je, takže se dá oprávněně soudit, že stravitelnost bílkovin mléka pepsinem se většinou snižuje se stoupajícím obsahem tuku. Totéž platí i pro ten případ, že bílkoviny mléka jsou tráveny směsí pepsinu a syřidla. Stejnou tendenci jako pepsin vykazuje i syřidlo, avšak v našem materiálu nebylo to nikdy prokázáno v míře statisticky významné. Totéž platí i pro směs Pe + Dy. Dymal sám choval se v obou souborech (tabulka II a III) naprosto protichůdně, jednou vykazoval neprůkaznou korelaci zápornou ($-0,298$), po druhé kladnou ($+0,147$), v souhrnu obou materiálů pak téměř žádnou korelaci ($-0,0415$) nevykazoval. Závěr, že proteolytický účinek Dymalu není závislý na obsahu tuku v tráveném mléku, je tedy velmi oprávněný.

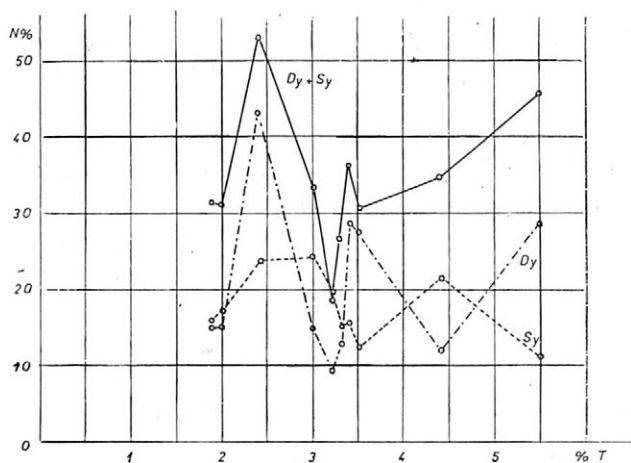


Diagram 6. Proteolytický účinek syřidla (Sy) a Dymalu (Dy) a jejich směsi 1:1 (Dy+Sy) na nativním kravském mléku. Na abscise obsah tuku v %, na ordinátě množství rozložených bílkovin v % vzhledem ke kontrole.

IV. Vztahy mezi obsahem tuku v mléku a proteolytickou účinností jednotlivých substancí na bílkoviny mléka.

T — obsah tuku, Pe — účinnost pepsinu, Sy — syřidla, Dy — Dymalu, Tabulka — číslo tabulky, z níž byly vztahy vypočteny, r — korelační koeficient, P — spolehlivost korelačního koeficientu, d_y — regresní koeficient.

Tabulka:	T : Pe	T : Sy	T : Dy
	1	1	2
r P b_y	-0,719 <0,001 -2,265	-0,235 >0,10 -0,569	-0,298 <0,10 -2,585
Tabulka:	2	3	3
r P b_y	-0,308 >0,10 -0,926	-0,287 >0,10 -1,203	+0,147 >0,10 +1,379
Tabulky:	1 + 2	1 + 3	2 + 3
r P b_y	-0,548 <0,001 -1,695	-0,259 >0,05 -0,881	-0,0415 >0,10 -0,376
	T : (Pe + Sy)	T : (Dy + Pe)	T : (Dy + Sy)
r P b_y	-0,480 <0,001 -1,587	-0,246 >0,05 -1,571	-0,219 >0,10 -1,805

Z tabulek II a III a z diagramů 5 a 6 je hned na první pohled zřejmo, že křivky Dymalu ve směsi s pepsinem nebo se syřidlem převyšují obě křivky, tj. jak účinností samotného Dymalu, tak samotného syřidla. Je tedy jasné zřejmo, že obě substance se ve svých účincích sčítají (z toho ovšem nevyplývá, jak již bylo dříve uvedeno, že jde o substance totožné!). Dymal tedy působí v telecím slezu stejně jako proteáza vyloučená jeho stěnou (kvantitativně samozřejmě!), a to i za téže koncentrace, vodíkových iontů, při níž se projevuje kathepsinová účinnost, kterou Dymal zvyšuje, pokud nepřihlížíme k tomu, že Dymalem se bílkoviny hlouběji štěpí než žaludeční proteázou. Pokud jde o tvar a průběh křivky Dymalu s pepsinem nebo syřidlem, vidíme, že vcelku zachovává velmi dobře tvar a průběh křivky dymalové, přitom se však velmi citlivě zvyšuje v oblasti vzestupujících hodnot pepsinových a syřidlových. Můžeme tedy oprávněně předpokládat, že celkový proteolytický účinek uvedených směsí s Dymalem bude svým funkčním mechanismem převážně odpovídat proteázám plísňovým, avšak za přítomnosti žaludečních proteáz se bude zvyšovat.

V našich pokusech jsme sledovali především komplexní jednorázový účinek směsí, neboť tento nám dává jednoznačnou odpověď na naši otázku o upotřebitelnosti Dymalu (nebo podobné plísňové proteázy) u telat ve stadiu mléčné výživy. Pro doplnění uvádíme ještě dva grafy z literatury. Ačkoliv tyto diagramy

zobrazují výsledky při pH 8,8, tedy v oblasti značně alkalické (vzhledem k předpokladům, na nichž jsme postavili naši problematiku) a týkají se kombinace houbových proteáz s proteázami pankreatickými, přece mohou sloužit jako vhodný doplněk našich výsledků, neboť jasně naznačují, že účinek Dymalu nekončí tím, že se žaludečním chymem opustí žaludeční dutinu. Právě naopak. Při alkalické reakci se teprve plně rozvine proteolytická účinnost Dymalu. Tímto způsobem je zajištěna ještě další důležitá podmínka, aby i po použití preparátu ke zvýšení trávicí činnosti trávení plynule postupovalo v celém trávicím traktu a aby jednotlivé fáze systematicky na sebe navazovaly od části žaludeční až po tlusté střevo. Na nutnost respektování této zásady upozornil ve svých novějších pracích B u c h s (1954).

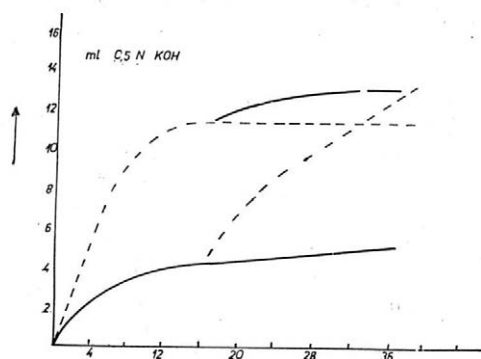
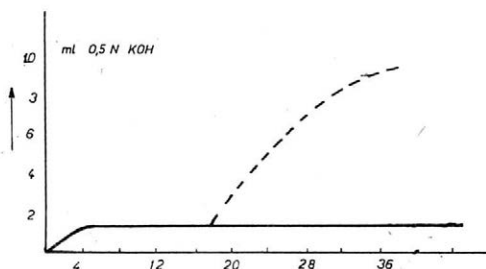


Diagram 7. Trávení želatiny pankreatickými a houbovými proteázami. Plná čára pankreatické proteázy, přerušovaná houbové proteázy. Údaje na abscise udávají dobu, kdy byla proteáza ke druhé přidána. Na abscise čas (v minutách), na ordinátě množství uvolněných aminokyselin vyjádřeno titrační spotřebou KOH (ex Grassmann, Mayer a Waldschmidt-Leitz, 1950).

Diagram 8. Trávení vaječného bílku pankreatickými proteázami (plná čára), na jejichž působení navazuje činnost přidávaných proteáz houbových (přerušovaná čára). Na abscise čas (v minutách), na ordinátě množství uvolněných aminokyselin vyjádřeno titrační spotřebou KOH (ex Grassmann, Mayer a Waldschmidt-Leitz, 1950).



Souhrn

1. Při trávení bílkovin mléka v oblasti pH 4,5 není praktického rozdílu v proteolytické účinnosti pepsinu a syřidla. Účinky obou substancí se ve směsi počítají.
2. V případě achylie, hypaciditidy či anaciditidy se mohou tyto substance (pepsin a syřidlo) uplatnit i při pH 4,5 a dá se jich proto při perorální aplikaci použít k substituci chybějících proteáz ve slezu telete, zvláště pro trávení mléka.
3. Dymal — digestivní preparát připravený z plísňe *Aspergillus orizae* — tráví bílkoviny mléka při pH 4,5, dále tuky i škroby.
4. Charakteristika proteolytické účinnosti Dymalu je jiná než charakteristika pepsinu a syřidla.
5. Proteolytická účinnost Dymalu ve směsi s pepsinem nebo syřidlem se počítá, působí tedy proteolytická účinnost obou složek směsi v jednom směru.
6. Dymal je možno považovat za vysoce účinný rostlinný proteolytický preparát vhodný k substituci endogenní slezové proteázy pro trávení bílkovin mléka.

Literatura

Ballarin, 1951: Milchwissenschaft 6, 6, 18. — Bersin, 1954: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie, Leipzig. — Buchs, 1947: Die Biologie des Magenskathepsins, Basel. — Buchs, 1954: Hoppe Syel. Zeitschrift 296, 9. — Buchs, 1954: Zeitschrift f. Vitamine und Hormonforschung, 6, 4/5, 245. — Grassmann, Meyer u. Waldschmidt-Leitz, 1950: Aerzt. Forschung, 1, 17. — Horowitz, 1951: Disertace, München. — Jančařík, 1950: Příroda 5/6. — Jančařík, 1952: Sborník ČAZV 25, 6, 525. — Jančařík, 1952: Sborník ČAZV 25, 6, 534. — Jančařík, 1954: Úvod do fyziologie trávení hospodářských zvířat, Praha. — Jančařík a Prokšová, 1955: Sborník ČSAZV 28, 1, 1-10. — Jančařík a Prokšová, 1955: Vědecké práce VÚK ČSAZV, 1, 61-106. — Jančařík, Prokšová a Reichl, 1957: Biologie výživy sajících mláďat, Praha. — Meyer, Fischer, Staub a Bernfeld, 1948: Helv. Chim. Acta 31, 2158. — Merten, 1950: Gastroenterologie 76, 2, 63. — Meyer, 1950: Süddeutsche Apothekerzeitung, 25, 35. — Pechmann, 1951: Biochemische Zeitschrift, 321, 549. — Scheid, 1951: Münch. med. Wchschr. 93, 1595. — Weber, 1956: Grundrisse der biologischen Statistik für Naturwissenschaftler, Landwirte und Mediziner, Jena.

Могут ли растительные протеазы применяться при переваривании белков молока в сычуге теленка?

1. При переваривании белковых веществ в молоке в области pH 4,5 нет практической разницы в протеолитическом действии пепсина и сычужного фермента. Влияние обеих субстанций в смеси складывается. 2. В случае ахилии, гипацидности и аницидности эти субстанции могут встречаться также при pH 4,5 и вследствие того можно ими пользоваться при пероральном употреблении для субституции отсутствующих протеаз в сычуге теленка, особенно для переваривания молока. 3. Дымал — дигестивный препарат, изготовленный из плесеней *Aspergillus oryzae* — при помощи его происходит переваривание белковых веществ молока при pH 4,5, далее жиров и крахмала. 4. Характеристика протеолитического действия Дымала иная, чем характеристика пепсина и сычужного фермента. 5. Протеолитическое действие Дымала в смеси с пепсином или сычужным ферментом складывается следовательно, протеолитическое действие обоих компонентов смеси проявляется в одном направлении. 6. Дымал можно считать высокоэффективным растительным протеолитическим препаратом, пригодным для субституции эндогенной сычужной протеазы для переваривания белковых веществ молока.

Können sich auch die Pflanzenproteasen bei der Milcheiweißverdauung im Kalblabmagen geltend machen?

1. Bei der proteolytischen Milchverdauung in der pH-Zone 4,5 gibt es keinen praktischen Unterschied zwischen der Pepsin- und Labwirkung. 2. Im Achylie-, Hypazidität- oder Anaziditätsfalle können Pepsin und Lab bei pH 4,5 eine proteoly-

tische Wirkung ausüben und deshalb kann man sie auch peroral zur Ersetzung der im Labmagen fehlenden Proteasen anwenden. 3. Dymal — ein Verdauungspräparat aus dem Schimmelpilze *Aspergillus oryzae* — verdaut die Milcheiweißstoffe auch bei pH 4,5, weiter auch die Fette und Stärken. 4. Die Charakteristik der milcheiweißverdauenden Wirkung Dymals ist eine andere als die von Pepsin und Lab. 5. Die proteolytische Wirkung Dymals im Gemische mit Pepsin oder Lab summiert sich, d. h. daß ihre proteolytischen Wirkungen in derselben Richtung verlaufen. 6. Dymal erwies sich als ein hochwirkendes Pflanzenpräparat zum Ersatz der fehlenden Kalbmagenproteasen.

Komplement a teplota při hemolytických reakcích

Комплемент и температура при гемолитических реакциях

Komplement und Temperatur bei hämolytischen Reaktionen

Josef MATOUŠEK, technická spolupráce Hana VAŇKOVÁ,
Vlad. MATOUŠKOVÁ

Laboratoř biologie rozmnožování, ČSAZV, Liběchov

Došlo dne 29. IV. 1960

Úvod

Při odhalování krevních faktorů na krvinkách skotu se používá protilátek, které mají v odpovídajícím prostředí charakter hemolysinů. Tyto protilátky vytvářejí s erythrocyty nesoucími příslušné antigeny hemolytické reakce. Aby mohla nastat hemolýza krvinek, je vedle antigenu a protilátky-lysinu nutný ještě komplement.

Komplementem se nazývá skupina látek, jež jsou obsaženy hlavně v séru králíků a morčat. Proto se při hemolytických testech přidává k antiséru a krvinkám také sérum uvedených zvířat.

Stupeň a rychlost hemolýzy závisí také na teplotě prostředí.

Všeobecně se při hemolytických reakcích používá králíčí komplement a teplota mezi 22—27°C.

V uvedené práci jsme sledovali účinnost komplementu v séru jednotlivých králíků, účinnost morčecího komplementu a působení tří různých teplot na hemolytické reakce.

Metodika

Pro studium účinnosti komplementu v séru různých králíků bylo použito 17 králíků plemene činčila. K odběru krve byla použita zvířata obojího pohlaví ve stáří 1—2 let. Krev byla odebírána kardiálně v thiopentalové narkóze v množství 40 až 50 ml. Ihned po odběru byla krev uložena k vysrážení do lednice vyregulované na 2—4°C. Po 2 hodinách se vysrážené sérum odstředilo a uložilo do lednice při —15 až —25°C. Během jednoho týdne se zmrazené neředěné králíčí sérum přidávalo jako komplement při hemolytických reakcích s antisérem A₂ a CH₁₀. Jalovice a krávy, jejichž krvinky byly použity k hemolytickým testům jsou uvedeny v tabulkách I. a II. Princip hemolytického testu je popsán v předešlé práci (Matoušek, 1958). Teplota prostředí při hemolýze se pohybovala mezi 23—26°C.

Stupeň hemolytické reakce se ve všech případech, tedy i při studiu účinnosti morčecího komplementu a sledování teplot vyjadřoval součtem reakcí při postupném ředění geometrickou řadou, odečítaných v hodnotách 0—4 (0 — žádná hemolýza, 4 — kompletní hemolýza) po 2½ a 5 hodinách.

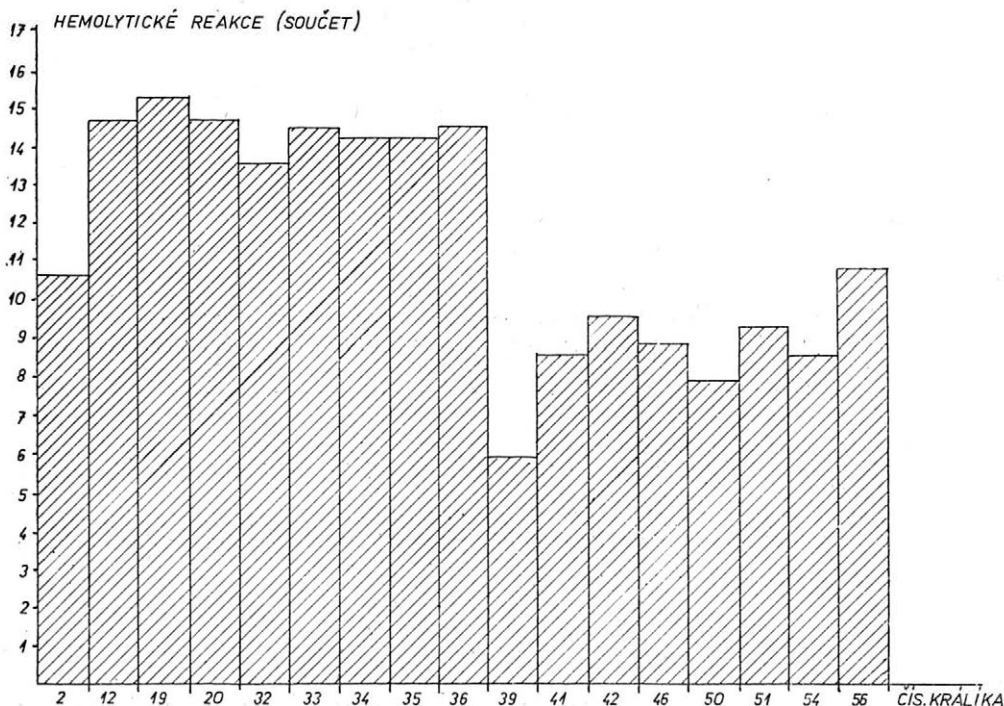
Pro sledování účinnosti morčecího komplementu byla kardiálně odebírána krev od dvaceti 14měsíčních samic. Sérum bylo získáváno a přechovávalo tímto způsobem jako u králíků. Před použitím bylo morčecí sérum ředěno 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, a

1:10 a použito jako komplement při hemolytických reakcích antisér CH x, L, G, Z, A'2 s erythrocyty zvířat uvedených v tab. III. Při sledování účinnosti morčecího komplementu se teplota prostředí pohybovala mezi 23—26° C. Pro srovnání účinnosti bylo použito králíčího séra neředěného a ředěného 1:1.

Při studiu vlivu teploty na průběh hemolytických reakcí byla použita antiséra anti-T, L, CH₅, CH₁₃, Z/— a CH₁₄. Hemolytické reakce při použití neředěného králíčího komplementu byly sledovány při teplotách 15, 26 a 37° C.

Výsledky

Ze srovnávání účinnosti komplementu v séru 17 králíků vyplynulo, že aktivita komplementu není u všech králíků stejná (tab. I, II, graf 1). Zjištěné rozdíly mezi některými zvířaty dosahují průkazných hranic. Např. mezi účinností komplementu králíků 19 a 25 je průkazný rozdíl $P < 0,01$.



Graf. 1. Účinnost komplementu 17 králíků

Pro vyrovnání účinnosti komplementu se doporučuje používat směsi sér nejméně 5 králíků.

Pokud jde o použití morčecího komplementu nesvědčí získané výsledky (tab. III.) o jeho přednostech vůči komplementu králíčímu. Hlavním důvodem je častá přítomnost přirozených protilátek v morčecím séru projevujících se někdy i při vyšším ředění a malá kvanta odebírané krve. Jestliže od dospělého králíka lze odebrat jednou měsíčně 50—60 ml krve, pak od morčete můžeme za tutéž dobu získat jen okolo 10 ml. Ředěním je možné poměry vyrovnat, ale účinnost morčecího komplementu se snižuje i když ne tolik jako účinnost komplementu v králíčím séru. Rovněž mortalita morčat je při odběrech větší. Při srovnání účinnosti králíčího komplementu v neředěném zmrazeném séru a séru ředěném 1:1, lze vidět u ředěného séra pokles.

I. Účinnost komplementu 17 králíků

Anti-sérum	Krvinky s odpovídajícím antigenem	Součet hemolytických reakcí po 5 hodinách u jednotlivých králíků																
		2	12	19	20	32	33	34	35	36	39	41	42	46	50	51	54	56
A ₂	79/15	16	16	15	15	16	16	16	12	16	4	10	10	9	11	8	10	8
	81/107	16	16	16	16	16	16	16	16	4	6	7	10	7	8	8	10	9
	94/591	7	—	16	—	15	—	8	—	—	—	—	—	—	—	—	3	3
	98/104	12	16	16	16	16	16	16	15	16	7	9	8	7	8	7	7	10
	100/577	13	16	12	16	16	16	16	16	15	5	8	12	8	7	4	6	11
	107/109	11	11	16	14	14	—	12	—	15	—	1	5	7	4	—	6	—
	117/116	16	16	16	16	16	16	15	16	16	12	12	11	8	11	15	15	16
	119/595	11	16	16	16	11	16	16	16	16	4	8	10	8	6	10	7	11
	125/121	4	12	—	11	9	16	16	12	9	1	1	10	8	—	5	7	7
	135/597	4	—	16	—	—	—	8	—	—	1	3	6	6	5	7	6	7
	140/595	15	—	16	—	16	—	16	—	16	12	16	15	14	13	12	13	15
	Š 30	4	16	8	16	13	16	8	16	8	11	14	12	14	12	14	14	15
	Š 35	4	—	16	6	3	4	—	7	—	—	—	—	2	1	3	4	8
Průměr		10,2	13,9	14,9	14,2	13,1	14,6	13,3	14,0	13,1	6,3	8,0	9,9	8,1	7,8	8,4	8,3	9,6

II. Účinnost komplementu 17 králíků

Anti-sérum	Krvinky s odpovídajícím antigenem	Součet hemolytických reakcí po 5 hodinách u jednotlivých králíků																
		2	12	19	20	32	33	34	35	36	39	41	42	46	50	51	54	56
CH ₁₀	82/503	16	16	16	16	16	16	16	12	16	5	5	8	6	8	7	7	8
	96/113	16	16	16	16	16	16	16	14	16	6	8	11	7	9	9	9	12
	102/95	16	16	16	16	16	12	16	16	16	3	7	12	6	5	7	5	8
	105/586	12	16	16	15	16	15	16	14	16	—	3	8	6	—	5	6	7
	115/102	16	16	16	16	16	16	16	16	16	11	12	11	9	10	14	11	16
	124/138	12	16	16	16	15	16	16	16	16	4	8	9	9	6	9	6	11
	126/119	4	16	16	16	12	15	15	12	16	6	9	12	13	7	14	10	15
	128/569	8	—	12	—	6	—	12	—	—	—	2	9	11	6	7	11	11
	131/184	10	16	16	12	12	15	15	14	16	1	8	10	6	6	12	9	14
	133/671	4	15	16	16	14	14	16	12	16	—	3	9	9	2	9	10	11
	144/111	15	16	16	16	15	15	15	16	16	8	11	10	15	3	9	5	11
	M 16	11	16	16	16	7	16	16	16	16	8	11	16	15	10	15	8	15
	Š 89	11	15	16	16	16	7	15	12	16	3	8	10	12	10	11	10	12
	146/1	6	—	16	—	15	—	14	—	—	7	9	14	13	6	8	8	11
Průměr		11,2	15,8	15,7	15,5	13,7	14,4	15,2	14,4	16	5,6	9,1	10,6	9,7	6,6	9,7	8,2	11,5

III. Účinnost morčecího komplementu a jeho srovnání s králičím

Anti-sérum	Krvinky s od-povídajícím antigenem	Součet hemolytických reakcí po 5 hod. v ředění					Srovnání s krá-ličím komplementem		Reakce v kontrolách — komplement + krvinky + fyziologický roztok NaCl						
		1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 8	1 : 10	neře-děný	ředěný 1 : 1	morčecí komplement v ředění					králičí	
									1 : 2	1 : 4	1 : 6	1 : 8	1 : 10	neře-děný	ředěný 1 : 1
CHx	82/503	24	23	22	18	16	22	20	0	0	0	0	0	0	0
	86/521	18	16	9	7	3	19	15	3+	1	0	0	0	0	0
	96/113	22	22	21	19	16	21	19	0	0	0	0	0	0	0
	102/95	17	15	14	14	9	20	16	0	0	0	0	0	0	0
	115/102	21	19	18	17	14	22	20	2	1	1	1	0	0	0
	124/138	22	20	20	15	9	21	19	0	0	0	0	0	0	0
	126/119	20	18	18	15	12	20	18	0	0	0	0	0	0	0
	131/184	19	18	19	14	7	18	16	1	1	1	0	0	0	0
	134/101	23	24	21	20	16	24	21	4	4	3	2	0	0	0
	137/105	24	23	21	21	18	23	19	0	0	0	0	0	0	0
	146/1	17	16	12	13	5	19	16	0	0	0	0	0	0	0
	Š 89	21	19	17	17	9	18	18	2	0	0	0	0	0	0
	M 16	18	16	10	12	5	17	16	1	1	0	0	0	0	0
	průměr	20,4	19,1	17,0	15,5	10,6	20,2	18,1	1	0,6	0,3	0,2	0	0	0
L	84/533				11		24	15				0		0	0
	87/598				12		25	18				0		0	0
	96/113				9		23	17				0		0	0
	100/577				16		22	20				0		0	0
	102/95				11		27	22				0		0	0
	106/366				14		21	16				0		0	0
	107/109				16—		22	15				0		0	0
	109/587				14		24	16				0		0	0
	117/116				12		25	21				0		0	0
	119/595				11		19	14				0		0	0
	124/592				12		21	15				0		0	0
	125/131				12		26	22				0		0	0
	127/120				15		21	16				0		0	0
	131/184				11		22	13				0		0	0
	137/105				14		25	18				0		0	0
	Š 30				13		23	15				0		0	0
	M 16				11		22	19				0		0	0
	průměr				12,5		23	17,2				0		0	0

G	95/106 100/577 102/95 128/596		22 17 24 17	20 17 23 14	17 17 23 10	18 14 12 8	23 21 24 20	— — — —	— — — —	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	0 0 0 0	— — — —
	průměr		20	18,5	16,7	13	22	—	—	0	0	0	0	0	—
Z/-	81/107 83/522 84/533 105/524 124/592 125/131 144/111	15 13 12 7 9 — 9	10 11 7 5 10 12 9	12 6 6 4 7 8 5	11 6 7 3 4 9 6	6 0 0 1 6 1 1	15 12 12 8 11 15 8	12 10 7 4 6 — 6	0+ 3 0 0+ 0 — 3	0+ 0 0 0 0 0 0	1 0 0 0 0 0 0	2 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0+ 0 0 0 0
	průměr	10,8	9,1	6,8	6,6	2,1	11,5	7,5	1	0	0,16	0,32	0	0	0
A ₂ '	79/15 81/107 87/598 100/577 104/517 109/587 117/116 119/595 125/131 132/213 139/503 Š 30	15 17 16 19 15 19 18 17 19 16 17 18	13 17 15 18 13 18 18 16 13 16 16 15	8 12 11 18 8 17 16 14 12 15 14 13	8 15 10 16 9 16 15 13 10 10 13 11	6 10 8 12 4 16 15 11 7 5 10 7	16 18 15 20 16 18 19 17 16 15 18 17	14 15 12 16 13 14 15 14 12 15 15 14	0 0 4 1 0 4 1 0 0 2 0 4	0 0 4 1 0 3 0 0 0 2 2 3	0 0 1 0 0 3 0 0 1 0 0 2	0 0 2 0 0 3 0 0 1 0 0 2	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
	průměr	17,1	15,6	13,1	12,1	9,2	17	14	1,3	1,2	0,5	0,6	0	0	0

IV. Hemolytické reakce při teplotách 15°, 26° a 37° C

Anti-sérum	Krvinky s odpovídajícím antigenem	Součet hemolytických reakcí po 5 hod. při teplotě			Anti-sérum	Krvinky s odpovídajícím antigenem	Součet hemolytických reakcí po 5 hod. při teplotě		
		15°C	26°C	37°C			15°C	26°C	37°C
T	73/1	17	17	14	L	125/131	13	15	13
	73/2	14	15	13		127/120	7	13	17
	83/522	9	15	12		131/184	12	15	15
	87/598	15	9	15		137/105	9	14	14
	94/591	19	19	19		Š 30	6	13	11
	100/577	18	16	19		M 16	9	14	15
	101/115	15	14	12		146/1	8	13	13
	109/587	16	17	14		146/2	8	15	16
	124/592	17	19	17					
	125/131	17	20	19					
	137/105	9	18	11		průměr	9,6	13	14,1
	146/103	15	17	13					
	146/1	17	19	18					
	146/2	19	20	18					
	Š 30	10	14	12					
	průměr	15	16,6	15					
L	84/533	8	11	12	CH ₅	89/117	19	21	24
	87/598	9	9	10		94/591	14	23	22
	94/591	10	11	12		95/105	19	22	23
	96/113	10	10	12		106/366	13	19	17
	100/577	14	14	14		107/109	14	18	16
	102/95	13	14	14		114/114	15	21	19
	106/366	9	9	10		126/119	16	19	18
	107/109	7	14	15		131/164	17	18	17
	109/587	13	15	16		132/213	12	18	15
	117/116	14	16	16		134/101	15	14	15
	119/595	7	12	12		137/105	16	21	17
						144/111	17	17	15
						146/103	13	18	16
						Š 35	17	20	16
						M 16	12	19	18
	průměr	15,2	19,2	17,8					

Otázka teploty prostředí při hemolytických reakcích je stále předmětem diskuse. Většina pracovníků zabývajících se studiem krevních skupin používá a doporučuje teploty mezi 22—27° C (Sørensen, 1958, Bouw, 1958, Braend, 1959). Jsou však pracovníci (Hall, 1958), kteří dokládají, že i při 15° C při prodloužení doby hemolytické reakce lze získat dobré výsledky.

Z našich pozorování je patrné, že v případě setkání specifické protialtky s odpovídajícím antigenem nastane po 2½ a 5 hodinách hemolýza krvinek jak při teplotách prostředí 26° C, tak i 15 a 37° C. Hemolytické reakce při 26° C však proběhly ve vyšším ředění. Při 15° C byla účinnost protilátek nižší. Reakce při 37° C se pohybovaly okolo hodnot získaných při teplotě 26° C. Lze tedy potvrdit, že teploty mezi 22—27° C jsou pro průběh hemolytických reakcí neoptimálnější, což je důležité hlavně při použití slabších antisér. Nižších teplot je možno použít jen po předběžném prověření antisér v těchto teplotách.

Souhrn

Účinnost komplementu v séru jednotlivých králíků není stejná. Rozdíly mezi některými zvířaty dosahují průkazných hranic. Pro vyrovnání účinnosti komplementu se doporučuje používat směsi sér nejméně 5 králíků.

V. Hemolytické reakce při teplotách 15°, 26° a 37° C

Anti- sérum	Krvinky s od- povídajícím antigenem	Součet hemolytic- kých reakcí po 5 hod. při teplotě			Anti- sérum	Krvinky s od- povídajícím antigenem	Součet hemolytic- kých reakcí po 5 hod. při teplotě		
		15°C	26°C	37°C			15°C	26°C	37°C
CH ₁₃	79/15	12	12	13	Z/-	146/103	17	19	19
	81/107	13	15	16		146/2	16	20	21
	83/522	12	15	13		72/1	19	21	22
	84/533	5	14	12					
	87/598	11	14	12					
	98/104	9	16	13		průměr	17,7	18,8	19
	102/95	14	14	16					
	105/524	10	16	12	CH ₁₄	79/15	8	15	
	124/592	12	16	10		83/522	7	14	
	125/131	13	13	15		84/533	5	13	
	104/517	9	12	10		87/598	8	13	
	146/2	14	13	11		95/106	10	18	
	Š 30	13	17	10		98/104	6	11	
	M 16	10	12	12		100/577	13	14	
				101/115		9	14		
				106/366		12	19		
				107/109		13	18		
				109/587		11	20		
				115/102		7	16		
				117/119		10	19		
				124/592		5	11		
				125/131	5	12			
				132/213	6	9			
				139/503	11	8			
				144/111	7	9			
				73/1	8	9			
				73/2	7	7			
				Š 35	12	12			
				Milý	13	14			
	průměr	11,2	14,2	12,5		průměr	8,8	13,3	
Z/-	46/73	14	14	16					
	83/522	18	19	18					
	94/691	19	19	20					
	101/115	17	20	19					
	109/587	20	20	21					
	112/453	18	19	19					
	124/592	21	20	21					
	137/105	16	18	16					
	139/503	17	15	16					
	144/101	15	21	19					

Při srovnávání králíčího a morčecího komplementu bylo prokázáno, že výhodnější je používání králíčího komplementu. Důvodem je jednak možnost získání většího kvanta séra, snadnější odběr krve a hlavně méně častá přítomnost přirozených protilátek proti erythrocytům skotu v séru králíků. Králíčí zmrazené sérum lze ředit nejvýše 1:1. Nejlépe je používat na komplement králíčí sérum neředěné.

Při sledování vlivu teploty prostředí 15, 26 a 37°C na průběh hemolytických reakcí se ukázala teplota 26°C jako optimální. Avšak i při 15°C probíhaly specifické hemolytické reakce. Rozdíly oproti 26°C spočívaly jen v intenzitě reakcí. U slabších sér je však možno předpokládat, že by nízkou teplotou mohlo dojít k zabrzdnění hemolýzy a je tedy nutno vždy účinnost antisér v těchto teplotách překontrolovat.

Literatura

1. Bouw J.: Blood Group Studies in Dutch Cattle Breeds. 1958. Stichting Bloedgroepen onderzoek. Wageningen. — 2. Braend Mikael: Blood Groups of Cattle in Norway. 1959. Skandinavisk Bladforlag. — 3. Hall J.: The V. European meeting of Blood Groups in Cattle. Helsinki 28.—30. July 1958. — 4. Matoušek J.: Grupi krovi u velikoi rogatoi chudobi. Visnik silskogospodarskoj nauki 11:81. 1958. — 5. Neimann-Sörensen A.: Blood Groups of Cattle. 1958. Carl Fr. Mortensen. København.

Комплемент и температура при гемолитических реакциях

Действие комплемента в сыворотке отдельных кроликов неодинаково. Разница между некоторыми животными достигает достоверных границ. Для выравнивания действия комплемента рекомендуется применять смесь сывороток не менее 5 кроликов.

При сравнении комплемента кроликов и морских свинок было доказано, что более выгодным является использование кроличьего комплемента. Причиной является как возможность получения большего количества сыворотки, так и более легкого взятия крови и, главное, менее частого наличия естественных антител, действующих на эритроциты крупного рогатого скота в сыворотке кроликов. Кроличью замороженную сыворотку можно разбавлять максимально 1:1. Лучше всего для комплемента использовать неразбавленную кроличью сыворотку.

При изучении влияния температуры среды от 15,26 до 37° C на ход гемолитической реакции оптимальной оказалась температура 26° C. Однако и при 15° C проходили специфические гемолитические реакции. Разница по сравнению с 26° C заключалась в интенсивности реакции. У более слабых сывороток, однако, можно предполагать, что при низкой температуре может произойти торможение гемолиза, поэтому необходимо всегда проверять действие антисывороток при этих температурах.

Komplement und Temperatur bei hämolytischen Reaktionen

Die Wirksamkeit des Komplementes im Serum einzelner Kaninchen ist nicht gleich. Die Unterschiede zwischen einigen Tieren erreichen nachweisbare Grenzen. Zwecks Ausgleich der Komplementenwirkung empfiehlt es sich, eine Serenmischung von mindestens fünf Kaninchen anzuwenden.

Beim Vergleich des Kaninchen- und Meerschweinchenkomplementes hat sich die Anwendung des Kaninchenkomplementes als vorteilhafter erwiesen. Der Grund dafür ist erstens die Möglichkeit der Gewinnung eines höheren Quantum von Serum, eine leichtere Blutentnahme, hauptsächlich aber ein selteneres Vorkommen von natürlichen Antikörpern gegen Rindererythrozyten im Serum der Kaninchen. Das tiefgekühlte Kaninchenserum kann höchstens 1:1 verdünnt werden. Für das Komplement ist es am vorteilhaftesten, unverdünntes Kaninchenserum anzuwenden.

Bei der Beobachtung des Einflusses der Umwelttemperatur von 15, 26 und 37° C auf den Verlauf von hämolytischen Reaktionen erwies sich die Temperatur von 26° C als optimal. Die spezifischen hämolytischen Reaktionen verliefen jedoch auch bei 15° C. Der Unterschied gegenüber der Temperatur von 26° C beruhte nur in der Reaktionsintensität. Bei schwächeren Seren kann jedoch vorausgesetzt werden, daß durch niedrigere Temperatur eine Hämolysen-Hemmung eintreten könnte; demnach ist es notwendig, die Wirksamkeit von Antiseren bei diesen Temperaturen zu überprüfen.

Vliv žloutků různých plemen slepic na přežití a oplozovací schopnost býčího spermatu

Влияние желтка разных пород кур на переживаемость и оплодотворяющую способность бычьей спермы

Einfluß von Dotter verschiedener Hühnerrassen auf das Überleben und Befruchtungsvermögen des Bullenspermas

Stanislav NOVOTNÝ

Laboratoř biologie rozmnožování ČSAZV v Liběchově

Došlo dne 14. IV. 1960

Úvod

Používání vaječného žloutku jako komponentu konzervačních roztoků pro sperma různých druhů domácích zvířat je úzce spojeno s otázkou tepelného šoku spermií po odběru. Již ve velmi malém množství dovede účinně zabránit změnám, vyvolaným náhlým kolísáním teploty. Milovanov (1951) zjistil, že již 5 % vaječného žloutku stačí při pomalém zchlazování zamezit nepříznivým změnám, 5–10 % umožňuje zchlazovat bez následku již poměrně rychle a 30 % žloutku v konzervačním roztoku chrání spermie před účinky maximálně rychlého zchlazení. Ochranná schopnost žloutku je úzce spjata s poměrně vysokým obsahem lecitinu, který dovede, jak se domnívá Milovanov a Sokolovská (1959) při metabolismu za snížených teplot nahradit úlohu plazmalogenu, zjištěného ve spermiích Hartreem a Mannem (1959). Plazmalogen obsahující aldehydy vyšších mastných kyselin (stearová a palmitová) poklesem teploty snadno tuhne a blokuje celý systém výměny látkové. Lecitin s vysokým obsahem nenasyčených mastných kyselin tuhne při mnohem nižších teplotách a přebírá v metabolismu úlohu tuhnutí plazmalogenu.

Vedle látek, které chrání spermie před tepelným šokem, obsahuje vaječný žloutek řadu dalších složek, u kterých se předpokládá, že se též podílejí na látkové přeměně spermií. Tosic a Walton (1956) se pokusili účinek jednotlivých složek identifikovat a zjistili, že jak vaječný žloutek celkově, tak i některé jeho součásti význačně zvyšují respiraci samčích pohlavních buněk. Tak dialyzovatelná část žloutku zpočátku zvyšuje a později snižuje příjem kyslíku spermiemi. Autoři z toho usuzují, že jde o více složek, které se při dialýze uvolňují a přecházejí do vodního prostředí; některé z nich jsou odpovědné za vzestup respirace, jiné na pozdější inhibici. Naproti tomu nedialyzovatelné, v éteru rozpustné frakce jednoznačně příjem kyslíku zvyšují. Dalším výzkumem (Smith, Mayer, Merilan, 1956) bylo zjištěno, že některé součásti žloutku zvyšují aktivitu dehydrogenáz. Autoři se domnívají, že tento účinek přísluší cholesterolu. Lasley a Mayer (cit. 11) zjistili příznivé působení lipoproteinů, izolovaných ze žloutků, na biologické vlastnosti spermatu. Bialy a spolupracovníci (1957) použili lipoproteinové frakce vaječného žloutku jako komplementu konzervačního roztoku při zmrazování spermatu a zjistili, že 5 % této

látky zvyšuje odolnost spermií proti škodlivým účinkům nízkých teplot. Příznivý vliv spatřují autoři v působení lipoproteinů na permeabilitu buněčné membrány.

Působením kvantitativního podílu vaječného žloutku v konzervačním roztoku na životnost a oplozovací schopnost spermatu se zabýval Almquist (1951) a nezjistil rozdíly v zabřezávání při podílu 50, 25, 16,7 a 12,5 %. Naproti tomu Olds a spol. (1951) zjistili signifikantní rozdíly v zabřezávání při složení konzervačního roztoku 1:1 a 1:5 v neprospěch nižšího podílu žloutku.

Z předcházejícího přehledu je zřejmo, že působení vaječného žloutku na samčí pohlavní buňky je velmi mnohostranné a ne ve všech směrech zcela známé. K složitosti problému přispívá bezpochyby i vlastní složení žloutku, které se může měnit řadou vnitřních činitelů a vnějších podmínek, za kterých jsou slepice chovány. Uváděné průměrné složení žloutku (48,8 % vody, 32,6 % lipidů, 16,6 % bílkovin, 1,1 % minerálních látek a 1 % sacharidů) lze vnějšími podmínkami, jako je výživa a prostředí, do určité míry měnit. Na změny ve složení žloutku určitým podílem spolupůsobí sezónnost a stáří nosnic. Pronikavě působí na složení vajec individualita a plemenná příslušnost slepic. Znojilová (1956) a Znojilová, Pátková a Zoufalý (1956) zjistili ve složení vajec průkazné meziplemenné rozdíly. Blatná, Fragner a Krumphanzlová (1957) uvádějí, že obsah vitamínů ve vejcích ovlivňuje velmi silně individualita nosnic a sezónní vlivy. Meziplemenné rozdíly v obsahu vitamínů ani za standardních podmínek výživy autoři nezjistili.

Na základě těchto poznatků jsme přistoupili ke sledování účinku vaječného žloutku různých plemen slepic na životnost a oplozovací schopnost spermatu býků, abychom mohli doporučit inseminační praxi užívání žloutků plemene, jež by se v pokusech ukázalo jako nejvhodnější. V názoru, že plemenná příslušnost nosnic může mít vliv na konzervační schopnosti, nás utvrdila práce Ahnelta a Brockmana (1955), kteří zjistili rozdílnou účinnost vaječných žloutků na fertilitu kozlího spermatu.

Metodika

Pro pokus byla vybrána plemena slepic, která jsou běžně zastoupena v našem zemském chovu: Rodajlendky, wyandotky bílé, leghornky bílé a vlašky koroptví. Pokusné nosnice, vybrané z B chovů, byly stejného stáří a dobrého zdravotního stavu. Než bylo přikročeno k používání vajec těchto nosnic pro přípravu konzervačního roztoku, byly po tři měsíce chovány ve stejném prostředí a krmeny standardními krmivý. Krmná dávka pro nosnice se skládala ze 65 g ovsa, 20 g otrub pšeničných, 15 g sójových pokrutin, 90 g zelené píce, 6 g minerálních přísad a 0,5 g krmné soli. V pokusu bylo ředěno semeno čtyř plemenných býků červenostrakatého plemene, přibližně stejného stáří a stejné průměrné plodnosti.

Primus	136 narez. 1954 — 59,2 % průměr. plodnosti po 1. insem.
Nimrod	12 narez. 1954 — 54,7 % průměr. plodnosti po 1. insem.
Don	3 narez. 1954 — 54,3 % průměr. plodnosti po 1. insem.
Milý	179 narez. 1955 — 52,7 % průměr. plodnosti po 1. insem.

Od každého z těchto plemeníků byly odebírány 2 až 3 ejakuláty týdně, děleny na dvě části a ředěny žloutkocitráty, v nichž žloutek byl zastoupen dvěma plemeny slepic, které byly zapojeny v příslušném období do pokusu. Takto konzervované semeno bylo vydáváno do inseminačních obvodů I a IV. Pro pokus byly ředěny ejakuláty vyrovnané kvality, jejichž jakost byla před konzervací velmi přísně posuzována. Každý ejakulát po odběru byl makroskopicky ohodnocen a mikroskopicky byla posouzena hustota a pohyb spermií. Hustota i motilita spermií se hodnotily pětibodovým systémem. K ředění se používaly ejakuláty, které byly ohodnoceny v obou těchto ukazatelích stupněm 5, minimálně stupněm 4. Koncentrace se zjišťovala hemacytometricky. Z biologických zkoušek semene byla použita dehydrogenační zkouška podle Salisburyho, při níž se zjišťovala intenzita anaerobního metabolismu spermií — fruktolýzy, na podkladě délky doby odbarvení roztoku metylenové modře, přidaného k ředěnému spermatu. Pro pokusy byly použity ejakuláty, jejichž doba odbarvování nepřekročila 8,5 minuty. Takto předběžně prověřený ejakulát byl před vlastním ředěním rozdělen na dvě části a každý díl byl konzervován zvlášť při-

pravenými žloutkocitrátovými ředidly, při jejichž přípravě bylo použito žloutků podle plánu v příslušném období do pokusu zařazených dvou plemen slepic.

Příprava ředidla byla následující: 15 ccm sterilně získaného žloutku z čerstvých vajec se smíchalo se 45 ccm 3,8 %ního roztoku citrátu sodného. Tato směs se v prachovnici, z jedné třetiny naplněné skleněnými korálky, po 25 minut protřepávala na laboratorní třepačce a připravené ředidlo se po předeřtání na 35°C používalo ke konzervaci semene. Sled pokusných období za použití žloutku různých plemen v citrátožloutkovém ředidle:

od 1/6	do 15/6	RI IV. obv.	VK I. obv.	od 16/6	do 30/6	RI I. obv.	VK IV. obv.
od 1/7	do 15/7	WB IV. obv.	LB I. obv.	od 16/7	do 31/7	WB I. obv.	LB IV. obv.
od 1/8	do 15/8	RI IV. obv.	LB I. obv.	od 16/8	do 31/8	RI I. obv.	LB IV. obv.
od 1/9	do 15/9	WB IV. obv.	VK I. obv.	od 16/9	do 30/9	WB I. obv.	VK IV. obv.
od 1/10	do 15/10	RI IV. obv.	WB I. obv.	od 16/10	do 31/10	RI I. obv.	WB IV. obv.
od 1/11	do 15/11	LB IV. obv.	VK I. obv.	od 16/11	do 30/11	LB I. obv.	VK IV. obv.

Rozdělené ejakuláty byly po zředění zchlazeny na teplotu +20°C. Zchladené konzervované semeno bylo podle výše uvedeného plánu vydáváno do inseminačních obvodů. Jednou týdně byly z rozděleného ředěného spermatu každého pleménka odebrány vzorky a v laboratoři bylo sledováno množství živých spermií s progresivním pohybem vpřed první, druhý, třetí a sedmý den po odběru. Při stanovení počtu živých spermií bylo použito metody Sørensonovy. V terénu bylo prakticky prověřováno, jak se projevuje specifické složení žloutků plemen slepic, použitých při přípravě ředidla, na výsledcích technického osemenování.

V ý s l e d k y

Během pokusu byl sledován počet živých spermií v chladných testech ředěného semene, při jehož konzervaci bylo použito žloutků do pokusu zařazených plemen slepic. Prověřeno bylo 168 vzorků rozdělených konzervovaných býčích ejakulátů, u nichž byly (tab. I) propočteny průměrné hodnoty v jednotlivých pokusných obdobích v mikroskopickém ohodnocení, koncentraci, dehydrogenační zkoušce a poměru ředění. Propočteny byly průměry v procentu živých spermií první, druhý, třetí a sedmý den po odběru. Průměrné rozdíly mezi žloutky zapojených plemen při počítání živých spermií byly nepatrné. Nejnižší přežitelnost byla u spermatu ředěného žloutky wyandot bílých, nepatrně vyšší u vlašek koroptvích, podstatnější zvýšení bylo u leghornek bílých a nejlépe přežívalo semeno konzervované ředidlem obsahujícím žloutek rodajlender. Přihlédneme-li k odumírání spermií mezi prvním a druhým, druhým a třetím, třetím a sedmým dnem (tab. II) při použití žloutků do pokusu zařazených plemen slepic, neshledáme podstatných rozdílů. Ani individualita spermatu jednotlivých plemenů neprojevuje se podstatnější variabilitou v rozdílech živých spermií. Výsledky praktických zkoušek v terénu (tab. III) udávají počet zabřežlých a nezabřežlých plemenic po první inseminaci dělenými ejakuláty, konzervovanými za přísavku příslušného žloutku. Výkyvy od průměrné plodnosti jsou při některých kombinacích dosti značné. Aby byl přehled praktických výsledků jasnější, byly tyto rozdíly od průměrné plodnosti sestaveny tak, že zvýšení bylo označeno znaménkem +, snížení od průměru znaménkem —. Je-li vzata za základ nejvyšší plodnost, kterou vykazovalo semeno ředěné žloutkem wyandot bílých, vykazuje žloutek vlašek koroptvích zvýšení o 2,20 %, leghornek bílých o 7,61 % a nejvyšší je u spermatu ředěného žloutkem rodajlender o 8,76 % (tab. IV). Při srovnání laboratorních a praktických výsledků (tab. I a tab. IV) lze říci, že množství živých spermií je v přímé závislosti k oplozovací schopnosti.

Stejným stářím, ošetřováním, krmením pokusných nosnic, dělením ejakulátů a střídáním inseminačních obvodů, častým zapojováním použitých žloutků prověřovaných plemen během pokusného období jsme se snažili získat výsledky co nejobektivnější a vyloučit vlivy, které by konečné závěry zkreslovaly.

Výkyv, který se projevil proti očekávání v osmém měsíci (tab. III), byl způsoben zvýšenou přebíhavostí plemenic, jejíž příčinou byla sterilita.

I. Přezítí spermií při použití žloutků různých plemen slepic ke konzervaci ejakulátu

Použito žloutků plemene							Rhode Island				Vlaška koroptví				Leghorna bílá				Wyandota bílá			
měsíc	počet ejakulátů	hustota ejakulátů při odběru	pohyb ejakulátů při odběru	koncentrace ejakulátů	odbarvovací zkouška Salysbury (min)	poměr ředění	% živ. spermií 1. den	2. den	3. den	7. den	% živ. spermií 1. den	2. den	3. den	7. den	% živ. spermií 1. den	2. den	3. den	7. den	% živ. spermií 1. den	2. den	3. den	7. den
VI.	15	4,7	4,7	1,320	3,9	1:4,3	71,7	59,7	56,4	18,4	67,8	54,8	51,3	12,7								
VII.	17	4,4	4,5	1,209	5,0	1:3,9									60,7	49,7	42,5	6,3	57,9	47,4	40,2	4,8
VIII.	11	4,4	4,6	1,169	5,3	1:4,5	51,9	44,7	35,0	9,4					51,1	42,4	31,2	9,4				
IX.	12	4,5	4,6	1,166	5,0	1:4,4					52,6	43,9	35,9	11,8					52,3	43,4	35,8	11,7
X.	15	4,4	4,8	1,234	4,3	1:3,8	59,3	51,6	44,3	22,9									57,2	49,5	43,1	21,2
XI.	14	4,5	4,8	1,259	3,6	1:3,7					65,7	60,1	55,3	24	66,9	61,4	56,8	26,9				
VI.	Procentické rozdíly v přežití						3,9	4,9	5,1	5,7	x	x	x	x								
VII.															2,8	2,3	2,0	1,5	x	x	x	x
VIII.							0,8	2,3	3,8	0,0					x	x	x	x				
IX.											0,3	0,5	0,1	0,1					x	x	x	x
X.							2,1	2,1	1,2	1,7									x	x	x	x
XI.											x	x	x	x	1,2	1,3	1,3	2,9				

x je označen žloutek vajec plemen slepic v konservačním roztoku s nižším počtem přežívajících spermií.

II. Účinek žloutků na ejakuláty jednotlivých plemenů

Jméno plemena	Don 3			Primus 136			Nimrod 12			Milý 179			Průměr pokusné skupiny plemenů		
Plemeno slepic, z jejichž vajec žloutek se po užíval do ředidla	rozdíl v % živých spermii 1. – 2. den	rozdíl v % živých spermii 2. – 3. den	rozdíl v % živých spermii 3. – 7. den	rozdíl v % živých spermii 1. – 2. den	rozdíl v % živých spermii 2. – 3. den	rozdíl v % živých spermii 3. – 7. den	rozdíl v % živých spermii 1. – 2. den	rozdíl v % živých spermii 2. – 3. den	rozdíl v % živých spermii 3. – 7. den	rozdíl v % živých spermii 1. – 2. den	rozdíl v % živých spermii 2. – 3. den	rozdíl v % živých spermii 3. – 7. den	rozdíl v % živých spermii 1. – 2. den	rozdíl v % živých spermii 2. – 3. den	rozdíl v % živých spermii 3. – 7. den
RI	13,5	5,5	30,3	11,7	6,6	28,7	7,4	6,5	26,5	5,6	6,4	27,8	9,5	6,2	28,3
WB	7,2	7,4	28,2	10,9	7,0	27,5	7,9	6,8	26,4	9,8	7,6	26,8	8,9	7,2	27,2
VK	12,0	6,0	30,9	11,7	3,9	33,4	6,7	5,9	31,4	6,9	5,1	30,0	9,3	5,2	31,4
LB	9,4	7,9	28,4	8,6	8,0	30,0	8,1	6,5	29,6	7,6	8,2	29,5	8,4	7,6	29,3
Prům. hodn.	10,5	6,7	29,4	10,7	6,3	29,9	7,5	6,4	28,4	7,4	6,8	28,5	9,0	6,5	29,0

III. Výsledky praktického použití dělených ejakulátů

Pokusné období: měsíc	První inseminace za použití žloutků plemen slepic		% plodnosti	Rozdíl v % plodnosti od průměru	První inseminace za použití žloutků plemen slepic		% plodnosti	Rozdíl v % plodnosti od průměru	Průměrná plodnost v pokusném období
	+	–			+	–			
V.	VK		50,00	–4,50	RI		58,82	+4,32	54,50
	49	49			60	42			
VII.	LB		55,00	+0,37	WB		54,28	–0,35	54,63
	55	45			57	48			
VIII.	LB		57,79	+1,02	RI		55,90	–0,87	56,77
	63	46			71	56			
IX.	VK		67,42	+3,63	WB		60,54	–3,25	63,79
	89	43			89	58			
X.	RI		63,71	+0,80	WB		62,00	–0,91	62,91
	72	41			62	38			
XI.	LB		60,18	+1,71	VK		57,03	–1,44	58,47
	65	43			73	55			

IV. Rozdíly plodnosti dosažené dělenými ejakuláty

Plodnost ejakulátu se žloutkem WB = 100 %

Plemeno slepic, jejichž žloutek byl používán	Prvních inseminací	Rozdíl v % plodnosti	Měsíc, kdy bylo použito žloutků k ředění		
Wyandota bílá	352	—	VII.	IX.	X.
Vlaška koroptví	358	+2,20	VI.	IX.	XI.
Leghorna bílá	317	+7,61	VII.	VIII.	XI.
Rodajlendka	342	+8,76	VI.	VIII.	X.

Diskuse

Z prací Phillipse (1940), Lardyho (1945), Almquista (1951) a celé řady jiných autorů jasně vyplývá důležitost vaječného žloutku při konzervaci býčího a beraního spermatu. Organické substance vaječného žloutku ve svém vnitřním uspořádání jsou značně variabilní. Tosic a Walton (1956) se zabývali biochemickou analýzou jednotlivých součástí žloutku a došli k závěru, že obsahuje látky, které zvyšují respirační aktivitu spermií, ale i složky, které působí jako inhibitory. Například tuku prostý proteinový zbytek nedialyzovatelné části vaječného žloutku zvyšuje respiraci spermií. Tuky vaječného žloutku, jsou-li emulgovány ve fosfátovém pufru za přítomnosti malého množství lecitinu, taktéž zvyšují respirační aktivitu spermií, která je podle některých autorů (Chang a Walton, 1940) v přímé závislosti s oplozovací schopností. Množství látek, zvyšujících respiraci a pravděpodobně i oplozovací schopnost spermatu (Walton, Edwards, 1938), není konstantní u vajec různých druhů ptáků. Je ovlivněna u stejných druhů stářím, krměním, individualitou a především plemennou příslušností.

Na základě těchto závěrů provedl v roce 1955 Aehnelt a Brockmann praktické pokusy se semenem kozlů. Bylo sledováno přežití ředěných ejakulátů, při jejichž konzervaci bylo použito žloutků hampshirek, sussexek, leghornek bílých a vlašek koroptvích. Nejlepší výsledky jak v přežití, tak v oplozovací schopnosti vykazovalo sperma ředěné žloutkem plemene hampshire, horší výsledky sussex a nízké výsledky v plodnosti byly dosaženy při použití žloutků plemene leghorn a vlašek. Autoři v závěru své práce doporučují žloutky těžkých plemen jako vhodnější pro ředění spermatu.

Při našem srovnání se projevil nejméně vhodným pro konzervaci žloutek wyandot bílých, který vykazoval při počítání nejméně živých spermií a také nižší plodnost při inseminaci v terénu. Nejlepší výsledky vykazovaly žloutky rodajlendeck. V zásadě lze říci, že ejakuláty konzervované žloutky rodajlendeck vykazovaly o 3 % více živých spermií než ejakuláty ředěné přidavkem žloutku wyandot bílých. Semenem ředěným žloutky do pokusu zapojených slepic bylo provedeno 1369 prvních inseminací. Vezme-li se za měřítko žloutek vajec plemene wyandot bílých, jímž konzervované ejakuláty vykazovaly nejnižší oplozovací schopnost, zvyšuje se při použití žloutku rodajlendeck, kterým bylo dosaženo nejlepších výsledků, březost po první inseminaci o 8,76 %. Výsledky v inseminační praxi potvrzují pozorování *in vitro* a projevuje se přímá korelace mezi počtem živých spermií a jejich oplozovací schopností. Tato souvislost souhlasí s uzávěry Aehnelta a Brockmanna, ovšem rozdíly v počtu živých spermií v našem pozorování byly nepoměrně nižší. Je pravděpodobné, že na fertilitu spermií působí seskupení celé řady složek, obsažených ve vaječném žloutku, a pro objasnění by bylo třeba provést podrobnou biochemickou analýzu a sledovat působení jeho jednotlivých organických součástí na spermie.

Souhrn

Ze čtyř plemen slepic se autor snažil srovnávacím pokusem určit plemeno, jehož žloutky v ředidle působí biologicky nejprůzračněji na spermie. Ejakuláty čtyř plemenů červenostrakatého skotu byly po mikroskopickém a biochemickém prověření rozděleny a ředěny žloutkocitráty s přídavkem žloutku prověřovaných plemen slepic. Vychlazené konzervované semeno bylo používáno k umělým inseminacím a po třech měsících byla u inseminovaných krav rektálně zjišťována březost. U spermatu každého plemena jednou týdně byly provedeny chladné dlouhodobé testy, v nichž se zjišťovalo přežití spermií první, druhý, třetí a sedmý den po konzervaci. Ve vzorcích *in vitro* byly shledány nepatrné rozdíly v době přežití a motilitě spermií. Nejprůzračnější výsledky v přežití byly zjištěny při použití žloutku rodajlendeck, nižší leghornek bílých a vlašek koroptvích a nejnižší wyandotek bílých. Rozdíl v počtu živých spermií mezi nejvyššími a nejnižšími výsledky byl 3 %. Zcela stejné pořadí plemen slepic bylo shledáno při zjišťování plodnosti v inseminačních obvodech. Žloutek rodajlendeck vykazoval proti nejnižším wyandotkám bílým zvýšení březosti po první inseminaci o 8,76 %, leghorn bílých o 7,61 % a koroptvích vlašek o 2,20 %. Inseminační praxi bylo doporučeno ředění býčího spermatu žloutky rodajlendeck.

Literatura

1. Aehnelt E., Brockmann P., 1955: Zur Sperma verdünnung unter Verwendung von Eidottern verschiedener Hühnerrassen. Deutsche tierärztliche Wochenschrift 62:69. — 2. Almquist J., 1951: The fertility of bovine semen in diluters containing varying amounts of egg yolk. J. Dairy Sci., 34:763. — 3. Bialy G., Ludwig T. M., Hess E. A., Ely F., 1957: Influence of lipoprotein on the freezing of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 40:1189. — 4. Blatná J., Fragner J., Krumphanzlová J., 1957: Vitaminy v čerstvých vejcích. Živočišná výroba, 2:467. — 5. Brockmann P., 1956: Der Einfluß von Eidotter verschiedener Hühnerrassen auf die Lebensdauer von Ziegenbock- und Bullen-sperma sowie die Befruchtungsfähigkeit von Ziegenbock-sperma. Hannover. Ehemal. Geburtshilflich-gynäkologische Klinik u. Abt. für Haustierbesamung der Tierärztlichen Hochschule, 43 s. (disertace). — 6. Duward O., Oliver L., Seath D. M., 1951: The fertility of bull semen extended with yolk-citrate containing varying proportions of egg-yolk. J. Dairy Sci., 34:1081. — 7. Hartree F. E., Mann T., 1959: Plasmalogen in ram semen and its role in sperm metabolism. Bioch. J., 71:434. — 8. Milovanov V. K., 1951: O sposobach sochranenija semeni životnych. Novoje v biologii razmnoženija, Selchoziz. — 9. Milovanov V. K., Sokolovskaja J. J., 1959: Teorija chodnogo udara živčikov mlekopitajščich. Doklady VASCHNIL, 24, č. 8, str. 4. — 10. Orel V., Musil F., Znojilová V., 1957: Vliv selekce nosnic podle jakosti vajec na produktivitu nosnic a vztahy mezi jednotlivými technologickými vlastnostmi vajec. Živočišná výroba, 2:479. — 11. Smith J. T., Mayer D. T., Merilan C. P., 1956: Effect of egg yolk and its isolated constituents upon the dehydrogenase activity of bovine spermatozoa. J. Dairy Sci., 39:552. — 12. Šmerha J. a kolektiv, 1955: Speciální zootechnika. Díl první. Chov skotu. Praha (s. 305-308). — 13. Tosic J., Walton A., 1946: Effect of egg-yolk and its constituents on the respiration and fertilizing capacity of spermatozoa. J. of Agr. Sci., 37:69. — 14. Znojilová V., Pátková V., Zoufalý V., 1959: Příspěvek k poznání chemického složení vajec našich hospodářských plemen slepic. Živočišná výroba, 4:69.

Влияние желтка разных пород кур на переживаемость и оплодотворяющую способность бычьей спермы

Путем сравнительного опыта автор пытался из четырех пород кур определить породу, желток которой в растворителе действует в биологическом отношении наиболее благоприятно на спермию. Эякулаты четырех быков-производителей краснопестрого крупного рогатого скота после микроскопической и биохимической проверки были разделены и разбавлены желточным цитратом с прибавлением желтка

исследуемых пород кур. Охлажденная законсервированная сперма была использована для искусственного осеменения и спустя три месяца у осемененных коров ректально устанавливалась стельность. У спермы каждого быка-производителя еженедельно проводились холодные долговременные тесты, в которых определялась переживаемость спермиев на первый, второй, третий и седьмой день после консервации. В образцах *in vitro* была найдена незначительная разница во времени переживаемости и подвижности спермиев. Самые благоприятные результаты в переживаемости были получены при использовании желтков породы род-айланд более низкие у леггорнов белых и влашки короптви и самый низкий у виандотов белых. Разница в числе живых спермиев между максимальными и минимальными результатами была 3%. При установлении плодовитости в районах искусственного осеменения породы кур находились в совершенно одинаковой очередности. Желток род-айландов способствовал повышению стельности после первого осеменения на 8,76%, желток леггорнов белых — на 7,61% и влашек короптви — на 2,20% по сравнению с самой низкой стельностью при желтке виандотов белых. В практике искусственного осеменения рекомендуется разбавление бычьей спермы желтками род-айландов.

Einfluß von Dotter verschiedener Hühnerrassen auf das Überleben und Befruchtungsvermögen des Bullenspermas

Der Verfasser war bestrebt, durch einen Vergleichsversuch mit vier Hühnerrassen diejenige Hühnerrasse festzustellen, deren Dotter im Lösungsmittel auf Spermien biologisch am günstigsten einwirken. Ejakulate von vier Bullen des rotbunten Rindes wurden nach makroskopischer und biochemischer Überprüfung verteilt und mit Dotterzitraten unter Beigabe von Dotter der geprüften Hühnerrassen verdünnt. Der gekühlte konservierte Samen wurde zu künstlichen Besamungen angewendet; nach drei Monaten untersuchte man rektal die Trächtigkeit der besamten Kühe. Das Sperma eines jeden Bullen wurde einmal wöchentlich langfristigen Kühltasten unterzogen, bei welchen man das Überleben der Spermien den ersten, zweiten, dritten und siebenten Tag nach der Konservierung feststellte. Bei den *in vitro*-Proben fand man geringe Unterschiede des Überlebens und der Motilität der Spermien. Die günstigsten Ergebnisse der Überlebensfähigkeit wurden bei der Anwendung des Dotters der Rhodeländer, weniger gute bei weißen Leghorn und rebhuhnfarbigen Italienern und die ungünstigsten bei weißen Wyandotten festgestellt. Der Unterschied der Zahl lebendiger Spermien zwischen den höchsten und niedrigsten Ergebnissen betrug 3%. Bei der Feststellung der Fruchtbarkeit in den Besamungsdistrikten fand man dieselbe Reihenfolge der Hühnerrassen. Im Vergleich mit den niedrigsten Zahlen bei weißen Wyandotten wies der Dotter der Rhodeländer eine Trächtigkeitssteigerung nach der ersten Besamung um 8,76%, bei weißen Leghorn um 7,61% und bei rebhuhnfarbigen Italienern um 2,20% auf. Der Besamungspraxis wurde die Verdünnung des Bullenspermas mit Dottern der Rhodeländer empfohlen.

Diferenciace živých a mrtvých spermií cyaninem B

Дифференциация живых и мертвых спермий цианином В

Die Differenzierung von lebendigen und toten Spermien mittels Cyanin B

J. FULKA, M. VALENTA, A. PAVLOK, F. ICHA
Laboratoř biologie rozmnořování — ČSAZV, Liběchov

Došlo dne 14. XII. 1959

Úvod

Úspěch inseminačního zákroku závisí do značné míry na kvalitě použitého spermatu. Je proto pochopitelné, že byly a jsou dosud hledány metody, které by poskytly co nejobjektivnější charakteristiku získaných ejakulátů. Jednou z posuzovacích metod je také diferenční barvení, jehož cílem je určení poměrného zastoupení živých a mrtvých spermií. Princip metody spočívá na schopnosti některých organických barviv pronikat do protoplazmy mrtvých buněk a selektivně je barvit. Živé buňky zůstávají pak nezbarveny, neboť jejich membrána není pro barviva prostupná.

Této vlastnosti první využil Morosov (1938) (cit. Ožin a sp. 1959), který vypracoval způsob diferenciace samčích pohlavních buněk pomocí 5 % vodního roztoku eosinu. Lasley, Easley a Mc Kenzie (1942) použili eosinu a opálové modři. Opálová modř vytvářením tmavého pozadí sloužila k lepšímu rozlišení zbarvených a nezbarvených spermií. Blom (1950) (cit. Laing 1955) ji nahradil nigrosinem. V tomto složení se používá metody dosud. Další práce se zabývaly převážně jen již zdokonalením původního postupu. Hancock (1951) upozornil na možnost artefaktů při nedodržování standardních tepelných podmínek, Brochart (1953) zjistil rozdílnou barvitelnost v různých stádiích zráního procesu i v různých časových intervalech po odběru. Dott (1956) věnoval pozornost pH roztoků barviv a zjistil závislost i na tomto činiteli. Ovlivnění barvitelnosti ředěním ejakulátů sledovali Campbell, Hancock a Rothschild (1953). Vztah mezi poměrem zbarvených spermií a fertilitou u králíčího spermatu hodnotil Beatty (1957).

Cílem předložené práce bylo zjistit možnost náhrady eosin-nigrosinu výrazněji se projevujícím barvivem, aby mohlo být upuštěno od dvoufázového barvení.

Materiál a metodika

Sperma býků, beranů a králíků bylo získáno odběrem na umělou vaginu. Bezprostředně po odběru se hodnotila mikroskopicky jeho kvalita.

Pro vybarvení mrtvých spermií byla zkoušena některá barviva trifenylmeta-

nové řady (Schultz, 1931, dále jen SCH). Byly připraveny vodné roztoky rozpouštěním práškovitých preparátů těchto barviv, které jsou výrobkem fy J. R. Geigy v Basileji, v pufrovaných roztocích citranu sodného. Spermie byly s barvivem smíchány v poměru 1:1 (1 kapka barviva na 1 kapku spermatu) a zhotoveny opatrně jemné nátery na podložních sklíčkách, která byla předtím zbavena všech nečistot a dokonale odmaštěna chromsírovou kyselinou. Po odsátí přebytečné tekutiny se nechávaly preparáty zaschnout volně na vzduchu při pokojové teplotě. Pro ověření, zda získané výsledky nejsou nahodilé, bylo několik býčích, beraních a králičích ejakulátů vystaveno náhlému ochlazení tak, aby se dosáhlo vyvolání chladového šoku. Vyhodnocování se konalo pod mikroskopem při šestisetnásobném zvětšení jedním a pro občasnou kontrolu třemi pracovníky.

Ze zkoušených trifenylmetanových barviv bylo některých použito též jako redoxních indikátorů v manganometrii (Knap, 1929 a 1931), jako absorpčních indikátorů v argentometrii (Icha, Valenta, 1959, Valenta, Icha, 1960) a merkurimetrii (Bognár-Jelínek, 1957). K diferenčnímu barvení se nejlépe osvědčil cyanin B (SCH 329). Výhodou tohoto barviva je snadná rozpustnost a stálost v citrátovém pufru, pro vlastní hodnocení pak především dobrá rozeznatelnost zbarvených (mrtvých) spermií ve světle žlutém poli mikroskopu od živých, nezbarvených spermií. K diferenčnímu barvení je možno použít též eriozeleně B (SCH 777), ale světleji zeleně vybarvené spermie jsou ve žlutozeleném podkladu mikroskopického pole méně zřetelné. Ještě slaběji vybarvuje mrtvé spermie cyanolechtgrün (SCH 836) a některá barviva, jako např. alkalická modř 6B (SCH 811) je nebarví vůbec. Patentní modř (SCH 827) působí toxicky a není ji možno z tohoto důvodu k diferenčnímu barvení použít, i když mrtvé spermie jsou jinak poměrně dobře vybarveny. Setopalin (SCH 762), setoglaucin (SCH 755), setocyanin, malachytová zeleň aj. se jen nepatrně rozpouštějí v citrátovém pufru. Z uvedených důvodů uvádíme dále jen výsledky získané pomocí cyaninu B.

Z řady zkoušených koncentrací se ukázal jako nejvhodnější roztok obsahující 2 % cyaninu B v 3,1 %ním citrátovém pufru.

I. Množství zbarvených spermií v býčích, beraních a králičích ejakulátech s vyjádřením spolehlivosti výsledků při počítání různého počtu spermií

Sperma	Počet preparátů	Počítáno spermií na 1 preparát	Průměrné % zbarvených spermií (m)	Střední chyba prům. (m)	Standardní odchylka σ
býčí	8	100	14,7	1,47	4,17
		300	15,1	0,61	1,74
		500—800	16,7	0,48	1,37
	12	100	10,9	0,80	2,77
		300	10,6	0,56	1,94
		770—1100	11,0	0,29	1,00
beraní	10	100	23,7	0,92	2,93
		300	24,5	0,82	2,60
		800—1000	24,8	0,81	2,58
králičí	10	100	4,7	0,75	2,40
		300	5,5	0,78	2,48
		700—850	5,2	0,42	1,33

V ý s l e d k y

Přehledy počtu zbarvených spermií v býčích, beraních a králíčích ejakulátech jsou uvedeny v tab. I. V býčích ejakulátech bylo zjištěno od 10 do 15 % mrtvých, barvících se spermií. Tyto hodnoty odpovídají spermatu dobré až velmi dobré kvality, jak byly také mikroskopickým posudkem oceněny. Také beraní ejakuláty, u nichž byl počet odumřelých spermií daleko vyšší (okolo 25 %), odpovídaly pečlivě provedenému mikroskopickému ohodnocení. Stejně tak i králíčí sperma s vysokým počtem živých spermií.

Pro běžné stanovení je důležité nejnížší možné množství zjišťovaných spermií aniž by byla podstatněji ovlivněna spolehlivost výsledků. V tomto směru provedené šetření, při němž bylo počítáno 100, 300 a nad 500 spermií na jednom preparátu, ukázalo po statistickém vyhodnocení, že 300 pohlavních buněk je množství pro získání vyrovnaných výsledků zcela dostačující. Předpokladem je ovšem standardní technika a pečlivost při zhotovování nátěrů. Výsledky se statistickým zhodnocením jsou uvedeny v tab. I.

Abychom se přesvědčili, jak se podílí na přesnosti metody příprava preparátů, spočítali jsme 3300 spermií, vždy po 300 z jedenácti různých nátěrů téhož býčího ejakulátu, a 3300 spermií z různých částí jednoho preparátu. Výsledky uvedené v tab. II ukazují, že příprava preparátů, je-li správně postupováno, ovlivňuje výsledky jen velmi málo i přesto, že byl k tomu účelu vybrán ejakulát s vysokým obsahem odumřelých spermií a tedy i značnou možnou variabilitou mezi jednotlivými nátěry.

II. Vliv preparátů na spolehlivost výsledků

Sperma	Počet preparátů	Počítáno spermií na 1 preparát	Průměrné % zbarvených spermií (M)	Střední chyba prům. (m)	Standardní odchylka σ
býčí	11	300	38,7	0,68	2,26
	1 × 11	3300	39,3	0,57	1,89

III. Vliv chladového šoku na barvitelnost spermií

Sperma	Počet ejakulátů	Zchlazeno na teplotu		
		30° C	15° C	0° C
		zbarveno spermií %		
býčí	6	12	52	97
beraní	4	18	63	95
králíčí	4	6	10	37

Jak ovlivňuje zásah nízkých teplot barvitelnost spermií, ukazuje tab. III. Rozdělením býčích, beraních a králíčích ejakulátů a náhlým zchlazením jednotlivých částí na 15° C a na 0° C bylo dosaženo vyvolání chladového šoku. Reakce spermií na tento zásah byla podle druhů velmi rozdílná. Býčí a beraní spermie reagovaly velmi citlivě, králíčí byly mnohem rezistentnější. Pro metodu samotnou je však důležité, že zjištěné hodnoty odpovídaly zcela přesně mikroskopickému obrazu.

Diskuse

Uvedené výsledky ukazují, že lze cyaninu B s úspěchem použít k diferenciálnímu barvení býčího, beraního a králíčího spermatu. Svými vlastnostmi se plně vyrovná roztoku eosinu, navíc umožňuje ve světležlutém poli mikroskopu snadno identifikovat mrtvé (zbarvené) spermie, aniž by bylo třeba používat pro zvýšení výraznosti dalšího barviva. Vzhledem ke snadné rozeznatelnosti živých a mrtvých spermií jsou poměrně malé difference mezi hodnotami zjištěnými jednotlivými pracovníky, menší než uvádí Beatty (1957) pro eosin-nigrosin. Také částečně zbarvených spermií je při zachování určitých podmínek (stejná teplota spermatu s roztokem cyaninu, absolutně čistá a odmaštěná sklíčka atd.) velmi málo. Pouze v beraních ejakulátech byl pozorován občasný jejich výskyt, který je zřejmě závislý od stupně vyžrálosti spermií, jak experimentálně dokázal Brochart (1953). Vedle diferenciace lze cyaninu B s úspěchem použít k určování morfologicky změněných spermií, které jsou většinou odumřelé a jako takové se chovají k vitálním barvivům.

Použitelnost cyaninu B není ovlivněna ani vyvoláním chladového šoku. Náhlým snížením teploty ze 30°C na 15°C a 0°C klesá proporcionálně počet živých spermií. Zásah je pronikavější u ejakulátů býčích a beraních než u ejakulátů králíčích. Poměr živých a mrtvých spermií odpovídá spolehlivě mikroskopickému obrazu nativních vzorků, což nepotvrzují ve své práci Waller a White (1959), kteří při studiu chladového šoku zjistili určité difference mezi množstvím zbarvených spermií a skutečnou kvalitou spermatu. Domnívají se proto, že pohybový aparát spermie je nízkými teplotami dříve a pronikavěji zasažen než celistvost povrchové membrány a její permeabilita.

Částečnou nevýhodou tohoto způsobu diferenčního barvení je vykrystalování poměrně hladkého podkladu, ke kterému dochází během několika hodin po zhotovení preparátů. Současně s krystalizací nastává také pronikání cyaninu do spermií původně nezbarvených. Z toho důvodu je třeba vyhodnocovat preparáty pokud možno brzy po zhotovení. V opačném případě by mohlo snadno dojít k získání falešných výsledků.

Souhrn

V práci je popsán způsob diferenčního barvení býčích, beraních a králíčích spermií pomocí trifenylmetanového barviva — cyaninu B. Cyanin B (2 % roztok v citrátovém pufru) se z řady zkoušených barviv projevil k tomuto účelu jako nejvhodnější. Proti eosinu má výhodu v tom, že mrtvé (zbarvené) spermie jsou ve světležlutém poli mikroskopu dobře viditelné i bez zdůraznění kontrastu jiným barvivem.

Nevýhodou je malá trvanlivost preparátů, zaviněná postupnou krystalizací barviva a jeho pozvolným pronikáním do původně nezbarvených spermií. Z toho důvodu je třeba preparáty vyhodnocovat během několika hodin po zhotovení.

Literatura

Beatty R. A., (1957): Nigrosin-eosin staining of rabbit spermatozoa and the fertility of semen. *Proc. Royal Soc. B.* 47:1. — Bognár J., Jellínek O., (1957): Magyar. Kém. Folyóirat. 12:399. — Brochart M., (1953): Origin of half-stained spermatozoa obtained from live-dead differentiating stains. *Proc. Soc. Stud. Fertil.*, 5:82. — Campbell R. C., Hancock J. I. and Lord Rotschild, (1953): Counting live and dead bull spermatozoa. *J. Exp. Biol.*, 30:44. — Dott H. M., (1956): Partial staining of spermatozoa in the nigrosin-eosin stain. III. *Inter. Congr. Anim. Reprod. Cambridge, Sect. III.*, p. 42. — Hancock J. L., (1951): A Staining technique for the study of temperature shock in semen. *Nature*, 167:323. — Icha F., Valenta M., (1959): Eriogrün B, ein neuer Adsorptionsindikator in der Argentometrie. *Collection* 24:2424. — Knop J., (1929): *Chem. listy* 23:399, *Z. Anal. Chem.* 77:111. — Knop J., Kubelková O., (1931): *Z. Anal. Chem.* 85:401. — Laing J. A., (1955): Fertility and infertility in the domestic animals. Bailliere, Tindall and Cox, London. — Lasley J. F., Easley G. T. and McKenzie F. F., (1942): A Staining method for the differentiation of live and dead spermatozoa. *Anat. Rec.*, 82:167. — Ožin F. V., Rodin I. I., Paršutin G. V., Statkin P. N., Šergin N. P., (1959): *Iskustvennoje osemenenije s. ch. životnych. Selchozgis, Moskva.* — Schultz G., (1931): *Farbstofftabellen Band 7.*, S. 322 Akademische Verlagsgesellschaft, Leipzig. — Valenta M., Icha F.: *Nové absorpční argentometrické indikátory triarylmetanové řady*, *Chem. zvesti. V tisku.* — Wales R. G. and White I. G., (1959): The susceptibility of spermatozoa to temperature shock. *J. Endocrin.*, 19:211.

Дифференциация живых и мертвых спермий цианином В

В работе описан способ дифференциальной окраски бычьих, бараньих и кроличьих спермий с помощью трифенилметанового красителя — цианина В. Цианин В (2% раствор в цитратном буфере) из ряда испытанных красителей оказался для этой цели самым пригодным. По сравнению с эозином его преимущество в том, что мертвые (окрашенные) спермии хорошо видны на светложелтом поле микроскопа даже без необходимости применения другого красителя.

Невыгода, однако, в малой долговечности препаратов, вызванной постепенной кристаллизацией красителя и медленным его проникновением в первоначально неокрашенные спермии. По этой причине препараты необходимо оценивать в течение нескольких часов после приготовления.

Die Differenzierung von lebendigen und toten Spermien mittels Cyanin B

In der Arbeit wird eine Methode der differenzierten Färbung von Bullen-, Schafbock- und Kaninchenspermien mittels des Triphenylmethan-Farbstoffes Cyanin B beschrieben. Das Cyanin B (2 % Lösung im Zitrat-Puffer) zeigte sich von der Reihe der geprüften Farbstoffe für diesen Zweck als das geeignetste. Der Vor-

teil gegenüber dem Eosin beruht darin, daß tote (gefärbte) Spermien im hellgelben Mikroskopfeld gut sichtbar sind, ohne den Kontrast durch einen anderen Farbstoff verstärken zu müssen.

Der Nachteil ist eine geringe Haltbarkeit der Präparate, welche durch stufenweise Kristallisierung des Farbstoffes und durch sein langsames Durchdringen in die ursprünglich nicht gefärbten Spermien verursacht wird. Aus diesem Grunde müssen die Präparate im Laufe von einigen Stunden nach der Herstellung ausgewertet werden.

- Jančařík A.: Mohou se při trávení bílkovin mléka ve slezu telete uplatnit i rostlinné proteázy?
 Могут ли растительные протеазы применяться при переваривании белков молока в сычуге теленка?
 Können sich auch die Pflanzenproteasen bei der Milcheiweißverdauung im Kalblabmagen geltend machen? 877
- Matoušek J.: Komplement a teplota při hemolytických reakcích
 Комплемент и температура при гемолитических реакциях
 Komplement und Temperatur bei hämolytischen Reaktionen 889
- Novotný S.: Vliv žloutků různých plemen slepic na přežití a oplozovací schopnost býčího spermatu
 Влияние желтка разных пород кур на переживаемость и оплодотворяющую способность бычьей спермы
 Einfluß von Dotter verschiedener Hühnerrassen auf das Überleben und Befruchtungsvermögen des Bullenspermas 897
- Fulka J., Valenta M., Pavlok A.: Diferenciace živých a mrtvých spermií cyaninem B
 Дифференциация живых и мертвых спермий цианином В
 Die Differenzierung von lebendigen und toten Spermien mittels Cyanin B 905

Nezapomeňte si zajistit

Sborník ČSAZV — Živočišná výroba č. 12

v jehož obsahu najdete řadu významných výzkumných poznatků, jež budete moci při své práci uplatnit:

CSc. inž. R. Šiler: Srovnání výtěžkovosti u jednotlivých typů bílého ušlechtilého prasete a plemen používaných k užitkovému křížení.

O. Haštbová: Rozmnožování a užitkové křížení slepic.

R. Kalina — K. Košar: Využití umělé inseminace ve velkochovech slepic.

Dr. J. Pavel: Kolísání obsahu enzymů amylázy a alkalické fosfatázy v mléce červenostrakatého skotu.

Dr. J. Pavel — J. Mácha — J. Čechovský: Užitkovost hřbíneckého skotu z hlediska produkce bílkovin a tuku v mléce za laktaci.

Sborník ČSAZV — Živočišná výroba č. 12 si můžete objednat u:

Poštovního novinového úřadu

Brno, tř. Obránců míru 2,

Československé akademie zemědělských věd

Praha 2 - Vinohrady, Slezská 7