

FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

JERZY MAZURCZAK, EWA SITARSKA

Rola układu podwzgórzowo-przysadkowego w regulacji cyklu płciowego samicy. II. Badania nad aktywnością wyciągów podwzgórzowych w różnych okresach cyklu płciowego

Katedra Fizjopatologii Wydziału Wet. SGGW w Warszawie
Kierownik: doc. dr J. MAZURCZAK

W pierwszej części pracy przedstawione zostały badania różnych autorów, którzy wykazują, że w jądrach zlokalizowanych w podwzgórzku znajdują się ciała czynne, które warunkują czynność wydzielniczą przysadki.

Badania *Guillemina* wykonane w latach 1962—1963 pozwoliły na bliższe określenie czynnika warunkującego wydzielanie LH (LH — releasing factor). Autor ten opracował metodę izolowania LRF z podwzgórza stosując odpowiednio postępowanie chemiczne (wg badań tego autora LRF zawarty jest w kwasnych wyciągach acetonowych). Badania nad znalezieniem odpowiednich czynników warunkujących wydzielanie FSH są dopiero w fazie badań początkowych. Pierwsze wyniki na ten temat przedstawił *Courrier* i wsp. (1963). Autorzy ci stosując wodne wyciągi z podwzgórza u samic szczurów uzyskali takie same efekty jak po podaniu czystego FSH. Na tej podstawie przyjęto domniemanie, że w stosowanych wyciągach znajdował się czynnik pobudzający wydzielanie FSH (FSH-releasing factor).

Doświadczenia wykonywane z podawaniem omawianych wyciągów prowadzone są na zwierzętach laboratoryjnych, u których cykl płciowy występuje regularnie, albo jest okresowy lub prowokowany. Najwięcej doświadczeń prowadzonych jest na samicach szczurów. U zwierząt tych cykl płciowy występuje regularnie w odstępach 3—5-dniowych. Istotnym warunkiem w omawianych badaniach jest konieczność zahamowania cyklu u zwierząt doświadczalnych, bowiem wówczas można właściwie ocenić efekt podanego wyciągu. Przygotowanie szczurów do takich doświadczeń polega na wykorzystaniu obserwacji opisanych w I części pracy, polegających na farmakologicznym zablokowaniu czynności neurosekrecyjnej podwzgórza. Ostatnio stosowane jest również postępowanie zaproponowane i opisane przez *Barracough* i *Gorskiego* (1961) oraz *Van der werff Ten Bosch* (1962) polegające na sterylizacji przed okresem dojrzałości płciowej (p. I cz. pracy).

Przygotowane w ten sposób zwierzęta nie wykazują czynności wydzielniczej gonad i są dogodnym modelem doświadczalnym, na którym można śledzić działanie podawanych wyciągów. Jeżeli takim zwierzętom podany zostanie wyciąg podwzgórzowy zawierający odpowiedni releasing factor (LRF lub FRF) dochodzi wówczas do wydzielenia przez przysadkę gonadotropin i w efekcie otrzymujemy reakcję ze strony jajników.

Analizując te badania można mieć zastrzeżenia, że opisywane doświadczenia pozwalają badać skuteczność wyciągów, ale nie przybliżają autorów do zasadniczej problematyki, jaka tkwi w tym zagadnieniu. Mianowicie na opisanych modelach doświadczalnych nie można zupełnie śledzić strony dynamicznej wzajemnych zależności istniejących między podwzgórzem, przysadką i gonadami. Dla śledzenia stanu dynamicznej równowagi zachodzącej między tymi dwoma układami opisywane modele doświadczalne z „zablokowanym podwzgórzem” nie przedstawiają większej wartości. U zwierząt takich nie

może być mowa o badaniu reakcji sprzężenia zwrotnego, mimo że reakcja ta jest zasadniczym warunkiem dla prawidłowego przebiegu jajczkowania.

Przytoczone zastrzeżenia mają swe potwierdzenie w obserwacjach poczynionych przez *McCanna* (1962), który stwierdził, że jeżeli bezpośrednio po podaniu wyciągów z podwzgórza podane zostaną niewielkie ilości estrogenów, to efekt pierwotnie podanych wyciągów zostanie całkowicie zniesiony. Doświadczenie to wykazuje, że w warunkach przyżyciowych (prawidłowych) układ podwzgórzowo-przysadkowy, któremu przypisuje się rolę nadrzędną w regulacji cyklu płciowego, jest bardzo uzależniony od hormonów wydzielanych przez gonady.

Z tych też względów oraz z uwagi na przytoczone zastrzeżenia, w badaniach własnych odstąpiono od przyjętego modelu jakim posługuje się większość autorów. Badania własne prowadzono na zwierzętach o fizjologicznym przebiegu cyklu.

Przedstawione badania mają na celu wykazanie różnicy w aktywności indywidualnych wyciągów podwzgórzowych w zależności od fazy cyklu płciowego samicy, od której pobrano podwzgórze. Ponieważ zagadnienie to jest bardzo złożone i wymaga opracowania szeregu różnych wariantów, aktualnie przedstawiane badania mają charakter wstępnych doświadczeń i ograniczają się do przeanalizowania aktywności podwzgórza w okresie jajczkowania i fazy późnego ciążka żółtego.

Metody

Badania przeprowadzono na samicach szczurów białych wagi 180—200 g dojrzałych płciowo. Przed przystąpieniem do zasadniczych badań zwierzęta poddano obserwacji przez okres trzech tygodni w celu ustalenia regularności jajczkowania. Coziennie wykonywano wymazy pochwowe i na podstawie obrazu cytologicznego określano poszczególne okresy obrazu płciowego. Z całej populacji badanych zwierząt wyizolowano dwie grupy:

I grupa tzw. „owców” — były to samice, z których jedne usypiano w dniu owulacji, inne w IV dniu cyklu (faza późnego ciążka żółtego). Pobrane bezpośrednio wyciągi po odpowiednim przygotowaniu podawano drugiej grupie zwierząt. Część z badanych zwierząt I grupy usypiano w innych dniach cyklu — w celu wykonania badań dodatkowych.

II grupa tzw. „biorców” — były to samice, którym przygotowany wyciąg podawano dożylnie w 3 dniu cyklu.

Wyciągi z podwzgórza przygotowywano w ten sposób, że pobrane podwzgórze poddawano bezpośrednio homogenizacji w temp. +4° w roztworze 0,9% NaCl w ilości 1 ml roztworu na jedno podwzgórze. Po odwirowaniu części stałych otrzymywano roztwór opalizujący, który w całości podawano dożylnie poszczególnej samicom z II grupy. Czas od pobrania podwzgórza do jego podania nie przekraczał 15 min.

U samic, które otrzymywały iniekcje, pobierano wymazy pochwowe przed wlewem, oraz po upływie

12, 24, 48 godz. Na podstawie obrazu cytologicznego pobranego wymazu określano efekt i skuteczność podanego wyciągu. Za wynik dodatni przyjęto wystąpienie złogów nabłonków złuszczonej bezjądrzastej (typowych dla fazy jajczkowania u szczura), pojawiających się w wymazie już po 12 godz. od momentu wlewu.

Ponadto wprowadzono badania uzupełniające polegające na wykonaniu preparatów histologicznych podwzgrzy u samic szczurów uspionych w fazie jajczkowania i fazy późnego ciała żółtego. Do badań histologicznych zastosowano metodę Gomori w celu uwidocznienia skupisk neurosekretnu w jądrach podwzgrzowych.

Omówienie wyników

W badaniach i ich ocenie posługiwano się głównie obrazem cytologicznym wymazów pochwowych. Ponieważ charakter wymazu jest wtórnym wykładnikiem procesów toczących się w układzie hormonalnym, należy przyjąć pewną tolerancję w określaniu zmian zachodzących w jajnikach w oparciu o wykonane wymazy. Niemniej wartość diagnostyczna wymazu, zwłaszcza u samicy szczura, jest nadal jednym z istotniejszych kryteriów oceny stanu jajników u tych zwierząt.

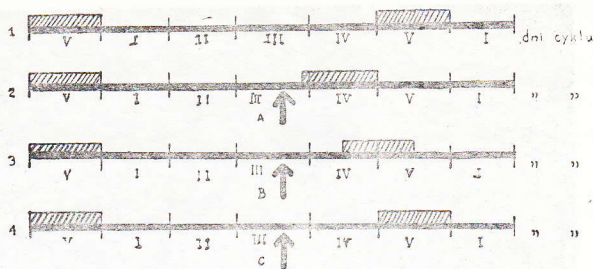
Tab. Występowanie nabłonków złuszczonej w wymazie pochwowym u samic szczurów (II grupa — tzw. „biorców”) po podaniu dożylnym wyciągów podwzgrzowych pochodzących od samic (I grupa tzw. „dawców”) będących w różnych fazach cyklu płciowego

Nr doświadczenia	Faza cyklu płciowego w momencie pobierania podwzgrza samicy I gr.	W wymazie pochwowym stwierdzono występowanie nabł. złuszczonej po upływie godz.:			Efekt działania wyciągów na wydz. gonadotrop.
		15	24	36*)	
I	V dzień cyklu (5) (faza estralna)	—	—	+	brak efektu
II	I dzień cyklu (5)	—	—	+	jw.
III	IV dzień cyklu (10)	+	+	—	wyraźny efekt pobudzający

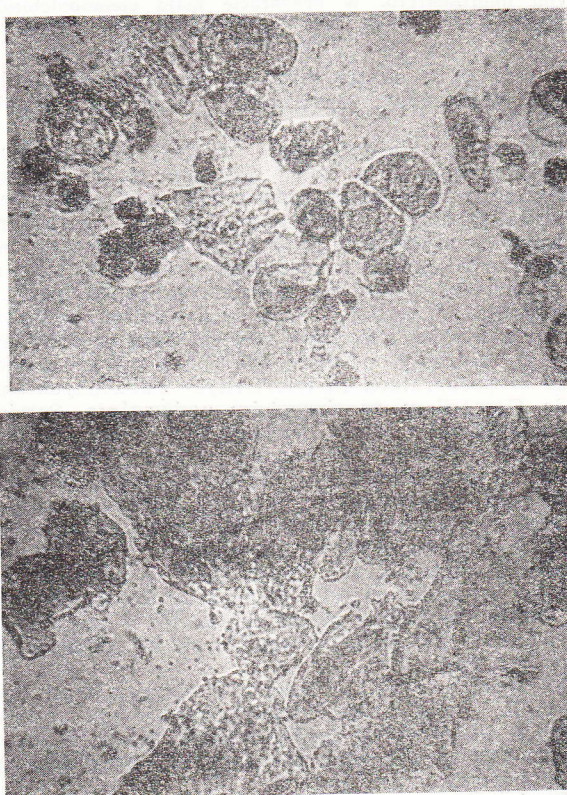
*) — od momentu podania dożylnego wyciągu
 + — oznaczono występowanie charakterystycznych zmian w wymazie cechujących fazę estralną
 — — oznaczono brak pow. zmian w wymazie
 cyframi oznaczono ilość zwierząt reagujących

W badaniach własnych przyjęto stosowanie iniekcji dożylnych w trzecim dniu cyklu w grupie „biorców”, ponieważ w tym dniu przypada połowa cyklu płciowego szczurów mających cykl płciowy 5-dniowy. Stwierdzono również, że reakcja na dokonany wlew w tym czasie i zmiany w nabłonku pochwowym mają wyraźny charakter. Przebieg doświadczeń oraz wyniki podane są w tab. 1. Graficzne ujęcie prowadzonych badań przedstawione jest na ryc. 1.

Z przeprowadzonych badań wynika, że aktywność podawanych wyciągów jest różna, w zależności w jakiej fazie cyklu wyciąg był przygotowany. Stwierdzono, że jeżeli były podawane wyciągi z podwzgrzy pobranych w fazie jajczkowania (fazie estralnej), albo pobrane w następnym dniu po owulacji, wówczas nie otrzymywano zmian w obrazie cytologicznym u biorycy, charakterystycznych dla fazy jajczkowania, po upływie 12—24 godz. od momentu podania wyciągu (dośw. 1 i 2 w tab. nr 1). Jeżeli natomiast podany był wyciąg z podwzgrza, które zostało pobrane od samicy w IV dniu cyklu, wówczas u biorycy bardzo szybko występowały zmiany nabłonka pochwowego (już po 12 godz.) typowe dla fazy estralnej (fot. 1). W niektórych przypadkach zmiany takie utrzymywały się przez 48 godz., w innych ustępowały już po 24 godz.

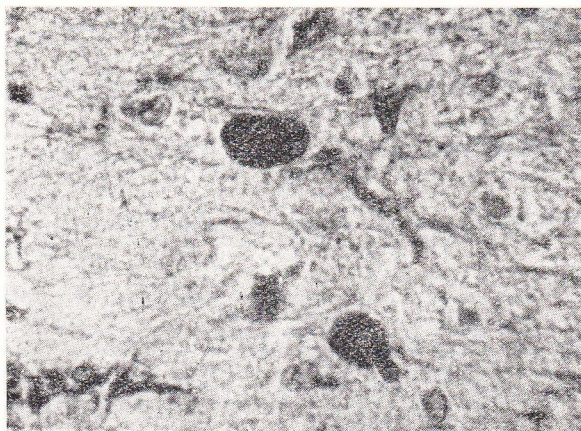


Ryc. 1. Przebieg wykonywanych doświadczeń w ujęciu schematycznym
 V—I = dni cyklu płciowego u badanych szczurów
 IIII = obraz cytologiczny wymazu pochwowego charakterystyczny dla fazy estralnej
 1—4 = nr szczurów użytych do doświadczenia
 ↑ = moment podania dożylnego badanego wyciągu
 A = wyciąg podwzgrzowy od samicy szczura będącej w IV dniu cyklu
 B = jw.
 C = wyciąg podwzgrzowy samicy szczura będącej w fazie estralnej.



Fot. 1. Obraz mikroskopowy wymazu pochwowego u samicy szczura przed i po podaniu wyciągu:
 a — przed podaniem wyciągu (III dzień cyklu)
 b — w 12 godz. od podania wyciągu pochodzącego od samicy w IV dniu cyklu

Na podstawie takich wyników przyjęto założenie, że wyciągi podwzgrzowe wykazują różną aktywność, która zależy od fazy cyklu płciowego zwierzęcia, od którego zostało pobrane. Jeżeli podwzgrze zostało pobrane w fazie owulacyjnej, wówczas aktywność jego jest znikoma i wyciąg z takiego podwzgrza nie wpływa pobudzająco na wydzielanie gonadotropin przysadki *in vivo*. W takich przypadkach we własnych badaniach nie obserwowano występowania zmian nabłonka pochwy właściwych dla fazy owulacyjnej po iniekcji wyciągu. Jeżeli podwzgrze pochodziło od samicy szczura, którą uspięno w fazie późnego ciała żółtego (IV dzień cyklu), podany wyciąg działał stymulująco na wydzielanie gonadotropin przysadkowych (LH?), które powodowały w bardzo szybkim czasie (w 12—24 godz. po iniek-



Fot. 2. Preparat histologiczny wykonany z podwzgórza samicy szczura, którą uśpiono IV dnia cyklu. Widoczne na zdjęciu dwie ciemne plamy są skupiskami rozakomórkowymi neurosekretu. W preparacie mają ciemnoniebieskie jednolite zabarwienie. (Preparat barwiony met. Gomori'ego, pow. 900 X)

cji) reakcje ze strony jajnika i następnie pod wpływem estrogenów jajnikowych reakcję nabłonka pochwowego.

Opisywane doświadczenia można interpretować w ten sposób, że w fazie późnego ciała żółtego podwzgórze zawiera znacznie więcej czynnego neurosekretu, aniżeli w fazie owulacyjnej. Neurosekret zawarty w wyciągach oddziałował na przysadkę (ponieważ zawierał prawdopodobnie „releasing factors”) i powodował wzmożone wydzielanie gonadotropin.

Sugestia ta wydaje się o tyle słuszna, ponieważ omawiane różnice w ilości neurosekretu w podwzgórze w zależności od fazy cyklu obserwowano również w preparatach histologicznych barwionych metodą Gomori'ego ze skrawków podwzgórza. Samice, które uśpiono w fazie owulacji lub w dniu następnym po owulacji, wykazywały w podwzgórze tylko ślady po neurosekrecie (w postaci małych ilości lekko niebiesko zabarwionych skupisk leżących pozakomórkowo). Natomiast podwzgórze pobrane od zwierząt w IV dniu cyklu wykazywały znacznie większe skupiska neurosekretu lokalizujące się głównie w okolicy *mediana eminens*. Charakteryzowały się tym, że leżały najczęściej pozakomórkowo w postaci dużych, silnie niebiesko zabarwionych bezpostaciowych mas (fot. 2).

Opisywane wyniki są zbieżne z obserwacjami Leonardelli i wsp. (1963), którzy obserwowali również różnice ilościowe w występowaniu neurosekretu w podwzgórzach u świnek morskich na przestrzeni cyklu płciowego.

Ponieważ we własnych badaniach używano tzw. „surowego” wyciągu, nie można ustosunkować się do szczegółowych zagadnień, takich np. jak zawartość w wyciągu odpowiednich releasing factor dla LH i FSH i ich wzajemnych stosunków. Ponieważ liczni autorzy donoszą, że w podwzgórze występują duże ilości acetylocholin, histaminy itp., wpływ tych związków na zjawisko stymulacji przysadki może być również uwzględniony (Schreiber 1963). Wydaje się jednak, że w opisywanych doświadczeniach te związki nie odgrywały większej roli, ponieważ wyłącznie ich wpływ nie mógłby wywołać tak szybko występowania omawianych zmian w nabłonku pochwowym po podaniu wyciągu podwzgórza z fazy późnego ciała żółtego.

Na podstawie opisanycch badań, poza zasadniczym wnioskiem wskazującym na różną zawartość neurosekretu w podwzgórze w zależności od fazy cyklu płciowego, można wysunąć jeszcze jedną sugestię, już o charakterze czysto praktycznym. Mianowicie do ba-

dań nad aktywnością wyciągów podwzgórzowych wskazane jest używanie jako dawców tylko tych samiec, które znajdują się w odpowiedniej fazie cyklu płciowego. Wydaje się, że najbardziej odpowiednim momentem pobierania podwzgórzy jest faza późnego ciała żółtego.

Mazurczak J., Sitarska E. — Роль системы подбугорье-гипофиз в регулировке полового цикла самки. II Исследования активности экстрактов из подбугорья в разных периодах полового цикла.

Исследовали активность экстрактов из подбугорья в разных периодах полового цикла самок крыс. Самки крыс были усыпляемы в периодах эструс и диэструм. Сейчас же после усыпления брали подбугорья, из которых приготавливали водные экстракты. Полученные экстракты вводили другим самкам в периоде диэструм. Установлено, что экстракты полученные от самок умерщвленных в периоде диэструм вызывали уже в 12—24 часа после интравенозной инъекции в эпителии влагалища появление изменений характерных для периода эструс.

Такой же метод работы но с экстрактами от самок умерщвленных в периоде эструс не вызывал выше описанных изменений.

Полученные результаты авторы объясняют увеличенным количеством нейросекрета в подбугорья в диэстральном периоде полового цикла. Вывод этот авторы подтвердили результатами гистохимического исследования препаратов из подбугорья крыс усыпляемых в разные периоды полового цикла.

Mazurczak J., Sitarska E. — The role of the submontecule-hypothalamus system in the regulation of the sexual cycle of the female. II. Investigations on the activity of submontecule extracts at various times in the sexual cycle.

The authors investigated the activity of submontecule extracts depending on the time in the sexual cycle of female rats. The female rats were asphyxiated in the oestral and interoestral phases. Immediately after asphyxiation the submontecule was removed and water extracts were made. The extracts obtained were given to other female rats in the interoestral phase. It was found that the extracts from females asphyxiated in the interoestral phase caused, 12—24 hours, after administration intravenously, characteristic changes in the epithelium of the vagina, typical of the oestral phase.

The same procedure carried out with extracts from females asphyxiated during the oestral phase did not cause the changes described.

The occurrence of characteristic changes in the vaginal mucus, typical of oestrus in the female rat, after the administration of submontecule extracts from female rats asphyxiated in the interoestral phase, is explained by the authors as due to an increased content of neurosecretion in the submontecule at this period of the sexual cycle.

This conclusion is supported by histochemical investigations in making preparations from the submontecule of rats asphyxiated at various times in the sexual cycle.

Mazurczak J., Sitarska E. — Le rôle du système hypothalamo-hypophysaire dans la régulation du cycle génital de la femelle. Recherches sur l'activité des extraits hypothalamo-hypophysaires au cours de diverses périodes du cycle génital.

Les auteurs firent des recherches sur l'activité des extraits hypothalamo-hypophysaires en dépendance de la période du cycle génital des rates. Les rates étaient narcotisées au cours de la phase oestrale et interoestrale. Directement après la narcotisation on prélevait l'hypothalamus et on effectuait des extraits aqueux. Les extraits obtenus étaient appliqués à d'autres rates au cours de la période interoestrale.

*) Preparaty histologiczne wykonane zostały przez mgr B. Auleitber z Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt PAN.

On constata que les extraits provenant des rates anesthésiées pendant la période interœstrale causaient des changements dans l'épithèle du vagin, typiques pour la phase œstrale, environ 12—24 heures après l'application intraveineuse.

Le même procédé, effectué à l'aide d'extraits provenant de rates anesthésiées au cours de la période de l'œstrus, ne provoquait pas de changements comme ceux, décrits plus haut. Les auteurs expliquent l'apparition de changements caractéristiques dans le frottis vaginale, typiques pour les rates après l'injection d'extraits hypothalamo-hypophysaires provenant de rates anesthésiées pendant la phase interœstrale, par le contenu plus élevé de la neurosécrétion dans l'hypothalamus pendant le cycle génital.

Cette conclusion fut confirmée par les recherches histochimiques en faisant des préparations de hypothalamus de rates narcotisées au cours de différents périodes du cycle génital.

Mazurczak J., Sitarska E. — **Rolle des hypothalamo-hypophysen Systems in der Regulierung des weiblichen Geschlechtszyclus. II Teil. Untersuchungen über Aktivität der Hypothalamusauszüge in verschiedenen Perioden des Geschlechtszyclus.**

Die Verfasser führten Untersuchungen durch über Aktivität der Hypothalamusauszüge in Abhängigkeit

vom Geschlechtszyclus der Rattenweibchen. Die Tiere wurden in der estralen und zwischenestrallen Phase eingeschläfert. Unmittelbar nach dem Einschläfern wurden Hypothalamen entnommen aus welchen Wasserauszüge verfertigt worden sind. Die Auszüge wurden anderen Weibchen in der zwischenestrallen Phase eingegeben. Es wurde festgestellt, dass die von den in der zwischenestrallen Phase eingeschläfert Weibchen stammenden Auszüge, bereits nach 12—24 Stunden von intravenöser Verabreichung das Auftreten von charakteristischen Änderungen im Vaginalepithel — typisch für die estrale Phase, hervorgerufen haben.

Identisches Verfahren doch mit den Auszügen aus der estralen Phase der eingeschläfert Weibchen, lieferten keine beschriebenen Änderungen.

Das Auftreten von charakteristischen Änderungen im Vaginalausstrich typisch für die estrale Phase der Rattenweibchen nach dem Einguss der Hypothalamusauszüge von in der zwischenestrallen Phase eingeschläfert Weibchen, erklären die Verfasser durch erhöhten Inhalt an Neurosekret im Hypothalamus in diesem eben Geschlechtszyclus.

Diese Folgerung wurde durch histochemische Untersuchung der aus dem Hypothalamus entnommenen Präparate in verschiedenen Perioden des Geschlechtszyclus der eingeschläfert Rattenweibchen bestätigt.

JERZY ZWOLIŃSKI, MICHAŁ GANOWICZ, STANISŁAW SIUDZIŃSKI

Obserwacje niektórych wskaźników hematologicznych u ciężarnych klaczy

Katedra Szczegółowej Hodowli Zwierząt WSR w Poznaniu
Kierownik: prof. dr STEFAN ALEXANDROWICZ

Zakład Hodowli Koni
Kierownik: doc. dr JERZY ZWOLIŃSKI

Nieliczne, znane nam opracowania dotyczące tego zagadnienia, były zachętą do podjęcia wstępnych obserwacji nad zachowaniem się niektórych wskaźników krwi w różnych okresach ciąży u klaczy. Jako materiał posłużyły klacze pełnej krwi angielskiej stacjonowane w PSK w Iwnie. Wybrano tę właśnie rasę koni, wychodząc z przeświadczenia, iż jest ona genetycznie najmocniej skonsolidowana, a więc stanowi grupę najbardziej wyrównaną. Obserwacjami objęto początkowo 34 klacze, z których do końca doświadczenia udało się doprowadzić tylko 14 sztuk (tab. 1). Część bowiem klaczy jałowiała, inne już w trakcie badań zostały wybrakowane z hodowli lub przeniesione do innych stadnin, wreszcie kilka poroniło. Nie zawsze też można było pobrać próbki krwi we właściwym terminie i w ten sposób — nawet przy braku tylko jednej obserwacji — klacz musiała zostać wykluczona z obliczeń. Klacze, których krew posłużyła do badań nie pracowały, były zdrowe i zaliczone do elity materiału hodowlanego. Wiek ich wahał się od 6 do 18 lat.

Krew do prób pobierano pomiędzy godziną 8 a 10, z zachowaniem ogólnie przyjętych zasad, z żyły jarzmowej (*vena jugularis sinistra*). Pierwszą próbę krwi brano w dniu owulacji i stanowienia, drugą w dniu stwierdzonej żrebnosci, dalsze w 90, w 180 i w 270 dniu ciąży. Projektowane w założeniu pracy kolejne próby: przy objawach nadchodzącego porodu oraz w 3 dni po wyżrebieniu — udało się uzyskać tylko w kilku przypadkach, co niestety uniemożliwiło uwzględnienie tych dwóch okresów w dalszych rozważaniach. Ciężę stwierdzano badaniami przez prośnicę pod koniec trzeciego lub w początkach czwartego tygodnia, licząc od ostatniego pokrycia. Przebądano biały obraz krwi (barwienie metodą Pappenheima), obliczając średnie z 500 ciałek. Hemoglobinę określano wg Sahliego, czerwone oraz białe krwinki liczono w komorze Neubauera. Otrzymany materiał liczbowy opracowano statystycznie, posługując się testem t.

Tab. 1. Średnie niektórych wskaźników krwi u ciężarnych klaczy

Terminy pobierania prób	Czerwone krwinki w mln. w 1 mm ³	Hemoglobina w g %	Wskaźnik barwny	Białe krwinki w tys. w mm ³	Stosunek granulocytów do agranulocytów	Eozynofile w %	Neutrofile w %	Limfocyty w %
Owulacja i krycie	9,463,6	15,1	1,003	7,640,0	1,68	3,8	58,2	37,7
Stwierdzona ciąża	9,115,7	15,5	1,046	8,989,3	1,57	4,5	55,9	39,1
90-ty dzień ciąży	8,032,7	15,7	1,274	9,163,2	1,67	7,8	54,1	36,5
180-ty dzień ciąży	9,717,8	15,9	1,047	8,845,6	1,47	7,9	52,1	41,7
270-ty dzień ciąży	9,221,3	15,9	1,071	8,684,3	1,68	2,9	58,8	38,0
Zróznicowanie przy 5% poziomie istotności	istotne	nie-istotne	istotne	nieistotne	nieistotne	istotne	istotne	nie-istotne