

# Molekularny mechanizm inwolucji gruczołu mlekowego krowy<sup>\*)</sup>

JOANNA ZARZYŃSKA, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

Zarzyńska J., Motyl T.

## Molecular mechanism of bovine mammary gland involution

### Summary

Mammary gland remodelling is related to the cyclic growth and involution of secretor tissues regulated by a dynamic equilibrium between apoptosis and mitosis of mammary epithelial cells (MEC). In bovine mammary glands the loss of MEC populations begins after the peak of lactation, however, the most dynamic induction of MEC apoptosis is associated with cessation of milking at the beginning of the dry period. There are several factors which may affect the rate of MEC apoptosis in dairy animals, including systemic factors (the frequency and efficiency of milking, nutrition, galactopoietic hormones and reproductive status) as well as intra-mammary factors, such as: milk stasis and physical distension of the epithelium, feedback inhibitor of lactation-FIL, IGFBPs (IGFBP-3, IGFBP-5), Fas ligand, detachment from extracellular matrix and TGF- $\beta_1$ . It has been shown that TGF- $\beta_1$  is an antiproliferative and apoptogenic agent for bovine MEC, but the regulation of this cytokine expression in the mammary glands of cow is still unknown. Recent studies have revealed that TGF- $\beta_1$  expression in bovine MEC undergoes complex regulation by hormones of somatotrophic axis: GH, IGF-I and somatostatin.

Understanding the molecular mechanisms of bovine mammary gland proliferation and involution is indispensable in order to control mammary gland remodelling. This knowledge may lead to introducing new strategies for lactation cycle regulation and increase of milk production.

**Keywords:** mammary gland, involution, apoptosis

W cyklu laktacyjnym gruczoł mlekowy podlega cyklicznym procesom wzrostu tkanki wydzielniczej (mamogenezą) i jej inwolucji (zasuszanie), które regulowane są dynamiczną równowagą pomiędzy mitozą i apoptozą komórek nabłonka gruczołowego. Mamogenezę i inwolucję przedzielają okresy laktogenezy i galaktopoezy, czyli zapoczątkowania i podtrzymania wydzielania mleka w gruczole. Czas trwania galaktopoezy zależy od gatunku ssaka, a wiąże się zwykle z zapotrzebowaniem noworodka/novorodków na mleko jako pierwszy pokarm. Wyjątkiem są tu krowa i koza, u których okres galaktopoezy został wydłużony przez zabiegi hodowlane ponad potrzeby noworodka.

### Inwolucja gruczołu mlekowego w cyklu laktacyjnym

Zahamowanie pobierania mleka z gruczołu wiąże się z gwałtownymi zmianami w tkance gruczołowej i inicjacją procesu inwolucji, który przygotowuje gruczoł do fazy spoczynku lub kolejnego cyklu laktacyjnego. U podstaw procesu inwolucji leży apoptoza komórek nabłonkowych. Odnotowuje się zmiany składu wydzieliny, m.in.: gwałtowny spadek koncentracji laktozy i wzrost całkowitej koncentracji białek mleka.

Z inwolucją związane są ultrastrukturalne zmiany w komórkach nabłonkowych obserwowane już w 48 godzin po zaprzestaniu zdajania mleka. Największą zmianą są duże zastoinowe wakuole, wynikające z gromadzenia kropli tłuszczu i wakuoli wydzielniczych. Pozostają one do ok. 14. dnia. W tkance gruczołowej bydła w ciągu 2-3 tygodni zmniejsza się światło pęcherzyków, podczas gdy powierzchnia tkanki łącznej zwiększa się. Od 28. dnia pozostałe zapadnięte struktury pęcherzykowe są wyraźnie mniejsze niż w czasie laktacji, ale struktura pęcherzykowa zachowana jest przez cały okres inwolucji. Proces inwolucji gruczołu mlekowego bydła przebiega wolniej niż u gryzoni, a dzięki temu, że struktura pęcherzykowa gruczołu zostaje zachowana, proces laktacji może być powtórnie uruchomiony nawet po czterech lub więcej tygodniach inwolucji. W gruczole mlekowym krowy spadek liczby komórek nabłonkowych zaczyna się po szczycie laktacji, kiedy dynamiczna równowaga pomiędzy mitozą a apoptozą przesuwana jest w kierunku apoptozy. Jednakże najbardziej dynamiczna indukcja apoptozy komórek nabłonkowych związana jest z zaprzestaniem zdajania mleka na początku okresu zasuszania (23). Znanych jest kilka czynników ogólnoustrojowych, które mogą wpływać na intensywność apoptozy komórek

<sup>\*)</sup> Badania finansowane przez Komitet Badań Naukowych (grant Nr K029/P06/2001/2004).

nabłonkowych u przeżuwaczy, między innymi częstotliwość i efektywność doju, system żywienia, hormony laktogenne oraz status rozrodczy (2, 18).

### Programowana śmierć komórki jako fizjologiczna podstawa inwolucji

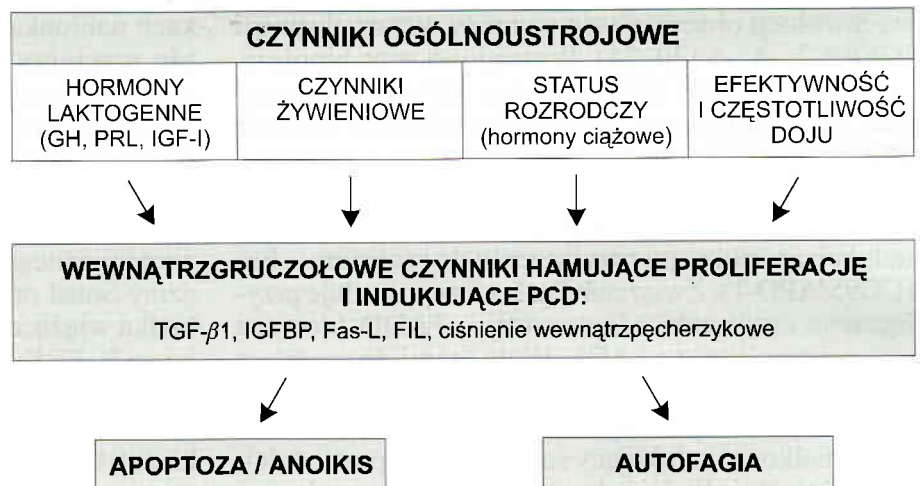
Apoptoza, czyli programowana śmierć komórki typu I, jest fizjologicznym procesem eliminacji komórek, który ma miejsce podczas organogenezy i przebudowy tkanek oraz w przypadku nienaprawialnych uszkodzeń komórki. Głównymi morfologicznymi przejawami apoptozy są: obkurczenie komórki, kondensacja chromatyny, pyknoza i fragmentacja jądra komórkowego oraz formowanie ciałek apoptotycznych. Wykazano, że apoptoza jest odpowiedzialna za spadek liczby komórek w czasie inwolucji gruczołu mlekowego po naturalnym odsadzeniu lub zabranii miotu u gryzoni, po odsadzeniu u loch (14), a także u krów i kóz w okresie zasuszania. Na podstawie badań morfologicznych i oceny ekspresji genów *Strange* i wsp. (19) zaproponowali hipotezę, iż podczas inwolucji występowanie apoptozy dzieli się na dwie fazy: wczesną, jest to ograniczona apoptoza związana ze spadkiem poziomu hormonów laktogennych oraz późną, o szeroko rozprzestrzenionym charakterze, zależną od proteaz, będącą odpowiedzią na zmianę oddziaływań pomiędzy komórką a macierzą pozakomórkową (rozluźnienie struktury).

Alternatywną do apoptozy śmiercią komórki jest autofagia (autofagocytosis), tzw. programowana śmierć typu II. Jest to proces przebiegający wolniej od apoptozy, który początkowo polega na powstawaniu autofagosomów, zawierających fragmenty cytoplazmy z organellami, a następnie ich fuzji z lizosomami, co prowadzi do tworzenia autofagolizosomów (wakuoli autofagicznych), w których ostatecznie dochodzi do enzymatycznej degradacji ich zawartości. W komórkach ssaków wyróżnia się trzy postacie autofagii: makroautofagię, mikroautofagię i autofagię zależną od chaperonów, których występowanie powiązane jest z typem komórek, rodzajem substratu i warunkami panującymi wewnątrz komórki (21). W makroautofagii fragmenty cytoplazmy przeznaczone do degradacji otaczane są błoną pochodzenia nielizosomalnego (mogą to być fragmenty RER wolne od rybosomów bądź sieci aparatu Golgiego, a także tzw. fagofor nieznanego pochodzenia), natomiast w mikroautofagii to właśnie błona lizosomalna ulega wpukleniu, otaczając substraty z cytoplazmy. W trzecim typie autofagii substraty wiązane są przez chaperony i dopiero takie kompleksy łączą się z receptorami na błonie lizosomalnej, które są mediatorami przeniesienia kompleksów do wnętrza lizosomu.

W przeciwieństwie do apoptozy, w autofagii cytoskielet jest późno niszczone, toteż komórka przez długi czas zachowuje swój kształt. Jądro komórkowe w początkowej fazie nie podlega zmianom strukturalnym, jedynie zapada się w głąb komórki. Nie występuje również charakterystyczna dla apoptozy kondensacja chromatyny.

### Czynniki indukujące apoptozę i autofagię w gruczole mlekowym

Czynniki indukujące apoptozę i autofagię w gruczole mlekowym krowy należy rozpatrywać dwupoziomowo, co zostało przedstawione na ryc. 1. Model ten obejmuje jako pierwszy poziom czynniki ogólnoustrojowe, takie jak: częstotliwość i efektywność udoju, czynniki żywieniowe, hormony laktogenne i status rozrodczy (2, 18). Czynniki te oddziałują na apoptozę i autofagię komórek nabłonka gruczołowego pośrednio, poprzez aktywację czynników wewnątrzgruczołowych.



Ryc. 1. Dwupoziomowy model regulacji apoptozy i autofagii w gruczole mlekowym krowy

Apoptoza komórek nabłonka gruczołowego indukowana jest bezpośrednio przez wewnątrzgruczołowe czynniki, takie jak: fizyczny wzrost napięcia nabłonka spowodowany zatrzymaniem mleka (23); białko nazwane zwrotnym inhibitorem laktacji (FIL) (23); białka wiążące IGF (IGFBP): IGFBP-5 (20), IGFBP-3 (1); Fas ligand (17); brak kontaktu z macierzą pozakomórkową (4) oraz transformujący czynnik wzrostowy-β<sub>1</sub> (TGF-β<sub>1</sub>) (13).

Zatrzymanie mleka w gruczole mlekowym, do którego dochodzi przy zmniejszaniu częstotliwości udoju bądź podczas zasuszania, powoduje wzrost ciśnienia wewnątrz pęcherzyków oraz fizyczny wzrost napięcia nabłonka gruczołowego. Dochodzi wówczas do deformacji uciskanych komórek, a w konsekwencji do przemieszczeń cząsteczek wewnątrzłonowych, które odpowiedzialne są za tworzenie tzw. połączeń ścisłych (tight junctions – TJ). Zjawiska te prowadzą do zaburzeń funkcji komórek, ponieważ połączenia ścis-

łe zaangażowane są w wewnątrzkomórkowy przepływ jonów wapnia oraz powiązane są z cytoszkieletem komórkowym (6).

FIL jest białkiem mleka syntetyzowanym przez komórki nabłonka gruczołowego, hamującym syntezę oraz wydzielanie kazeiny i laktozy, zaburzając ich transport błonowy. Wiadomo także, iż FIL zmniejsza ilość receptorów błonowych dla hormonów laktogennych, m.in. prolaktyny (18, 23), przez co komórki nabłonka gruczołu mlekowego stają się mniej wrażliwe na te hormony, a w konsekwencji podatniejsze na śmierć drogą apoptozy. Stężenie FIL w mleku może być kontrolowane poprzez częstotliwość i wielkość udoju, co umożliwi lokalne sterowanie procesem apoptozy.

Rodzina białek wiążących IGF-I (IGFBP) pełni ważną rolę, aktywując lub hamując fizjologiczne funkcje IGF-I. Wiadome jest, iż IGFBP, podobnie jak IGF-I syntetyzowane są przez komórki nabłonka gruczołu mlekowego. Podczas laktacji ekspresja IGFBP jest niewielka lub w ogóle nie notowana, natomiast w okresie involucji obserwuje się wyraźny wzrost ekspresji IGFBP-2, -4, -5 (20, 24). Postawiono więc hipotezę, że białka z rodziny IGFBP wiążąc IGF-I mogą hamować jego biologiczną funkcję i uruchamiać kaskadę zdarzeń prowadzących do indukcji procesu apoptozy.

Fas ligand jest białkiem należącym do nadrodziny TNF (czynnika martwicy nowotworu) i ma zdolność indukcji apoptozy po przyłączeniu do receptora – Fas (CD95/APO-1). Związanie FasL z Fas powoduje przyłączenie cząsteczki adaptorowej – FADD (domena śmierci powiązana z FAD), dzięki której do receptora wiążą się pro-kaspaza-8 (FLICE) i/lub pro-kaspaza-10. Tak powstały kompleks białkowy (DISC – kompleks białkowy indukujący śmierć) jest odpowiedzialny za aktywację kaskady kaspaz i inicjację sygnału pro-apoptotycznego (8).

Brak kontaktu komórek z macierzą pozakomórkową indukuje śmierć tychże komórek określaną mianem anoikis (apoptozą zależną od adhezji), zjawisko często obserwowane w gruczole mlekowym podlegającym procesowi involucji. Anoikis może być indukowana przez TRAIL (TNF-related apoptosis inducing ligand). Wiadome jest również, iż anoikis podlega kontroli (zarówno pozytywnej, jak i negatywnej) ze strony kinaz białkowych (16).

### **TGF- $\beta_1$ jako auto-/parakrylny regulator involucji gruczołu mlekowego krowy**

TGF- $\beta_1$  (25 kDa) jest wielofunkcyjnym peptydem regulacyjnym, stymulującym wzrost większości komórek mezenchymalnych, a hamującym wzrost komórek nabłonkowych, limfoidalnych, krwiotwórczych oraz śródbłonkowych. TGF- $\beta_1$  wydzielany jest przez komórki najczęściej w postaci nieaktywnej, związanej z białkiem LAP (latency associated protein). Kompleks ten może być dodatkowo wiązany (np. w trombocytach) przez białko LTBP (latent TGF- $\beta_1$  binding pro-

tein) i tworzyć tzw. duży kompleks latentny. TGF- $\beta_1$  działa na komórki za pomocą wiązania do specyficznych receptorów błonowych. Znane są trzy typy receptorów: I (53 kDa), II (70-80 kDa) oraz III (300 kDa). TGF- $\beta_1$  wiąże się z R II, który wówczas wchodzi w interakcję z RI. Następnie aktywny TGF- $\beta_1$ -R kompleks uczynnia wewnątrzkomórkowe przekaźniki sygnału, którymi są białka z rodziny Smad (7, 15), która dzieli się na trzy podklasy: R-Smady (Smad2, Smad3) – białka aktywowane przez receptor; Co-Smady (common-partner-Smad4) i I-Smady (Smad7) – białka hamujące przekazywanie sygnału. R-Smady oddziałują bezpośrednio z receptorem T $\beta$ RI i są przez niego fosforylowane, następnie tworzą heterokompleksy z białkiem Co-Smad i migrują do jądra komórkowego, gdzie pełnią funkcję czynników transkrypcyjnych.

Stwierdzono wzrost ekspresji TGF- $\beta_1$  i jego receptorów w komórkach nabłonka gruczołowego podczas involucji gruczołu mlekowego myszy (10), krowy (24), kozy (23) oraz lochy (14). TGF- $\beta_1$  hamuje proliferację, różnicowanie i syntezę białek mleka w komórkach nabłonka gruczołowego, a stymuluje formowanie macierzy pozakomórkowej. Wykazano także wpływ apoptogenny TGF- $\beta_1$  na komórki nabłonka gruczołu mlekowego myszy (10, 11, 13) i krowy (12). Wyniki badań własnych przeprowadzanych na komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła wskazują, że do białek zaangażowanych w przekaźnictwo sygnału apoptogennego należą czynniki transkrypcyjne z rodziny Smad oraz kompleks AP-1 (activator protein-1), białka wiążące IGF: IGFBP-3, IGFBP-4, kinaza białkowa B, ERK 1/2 oraz białka promotorowe apoptozy: Bad i Bax. Zablockowanie IGF-I poprzez IGFBP prowadzi do zahamowania ścieżki przeżycia zależnej od kinazy białkowej B i ERK 1/2, co połączone jest z aktywacją (defosforylacją) białka Bad, indukującego mitochondriałną ścieżkę apoptozy (3).

Pomimo zainteresowania TGF- $\beta_1$  jako czynnikiem indukującym apoptozę, mechanizm regulacji jego ekspresji w gruczole mlekowym bydła nie jest w pełni poznany. Na podstawie badań na innych gatunkach zwierząt do potencjalnych czynników regulatorowych zalicza się: prolaktynę (13), hormon wzrostu (5, 9), somatostatynę (9), steroidy płciowe, EGF (13) oraz IGF-I (9). Wykazano, że gen *tgf- $\beta$*  w komórkach nabłonka gruczołowego znajduje się pod supresyjnym wpływem hormonów laktogennych i czynników wzrostowych. Stwierdzono hamowanie ekspresji *tgf- $\beta_1$*  przez prolaktynę, EGF i IGF-I (9, 13), natomiast wzrost ekspresji tej cytokiny w końcu laktacji oraz w okresie zasuszenia, kiedy sekrecja hormonów laktogennych jest obniżona (14).

W badaniach własnych, prowadzonych na liniach komórek nabłonka gruczołu mlekowego bydła (BME-UV1 i MAC-T), stwierdzono supresyjny wpływ czynników wzrostowych: IGF-I i EGF na ekspresję TGF- $\beta_1$ , chroniący komórki przed apoptozą i zahamowaniem cyklu komórkowego (25). Podobny efekt odnotowa-

no w przypadku oddziaływania hormonu wzrostu na dobrze odżywione komórki. Natomiast w warunkach niedoboru składników bioaktywnych i odżywczych hormon wzrostu zwiększał ekspresję TGF- $\beta_1$ . Zaobserwowano także bezpośredni stymulujący wpływ somatostatyny na ekspresję TGF- $\beta_1$  w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła.

Wyniki badań prowadzonych na liniach komórkowych potwierdzone zostały badaniami immunohistochemicznymi, przeprowadzonymi na wycinkach tkanek gruczołu mlekowego pobranych od krów rasy holsztyńskiej, będących w różnych fazach cyklu laktacyjnego. Stwierdzono korelację pomiędzy wysoką ekspresją TGF- $\beta_1$  i jego receptora II a ekspresją białek wiążących IGF-I (IGFBP-4 i IGFBP-5) u krów zasuszonych, co sugerować może, iż zablokowanie IGF-I może odgrywać kluczową rolę w regulacji ekspresji TGF- $\beta_1$ . Tę hipotezę, zdaje się, potwierdza fakt najwyższej ekspresji receptora IGF-I (podjednostek  $\alpha$  i  $\beta$ ) oraz receptora hormonu wzrostu u krów we wczesnej laktacji, kiedy to ekspresja TGF- $\beta_1$  i jego receptora II kształtuje się na najniższym poziomie (24).

### Perspektywy

Poznanie molekularnych mechanizmów proliferacji i programowanej śmierci komórek w gruczole mlekowym bydła jest niezbędne do zrozumienia dynamiki zmian w populacji komórek gruczolowych, a co za tym idzie – stworzenia podstaw kontroli procesu involucji i możliwości sterowania przebudową gruczołu mlekowego. Przyszłe badania powinny umożliwić identyfikację potencjalnych metod manipulacji liczbą komórek gruczolowych oraz wprowadzanie nowych strategii regulacyjnych, mających na celu skrócenie okresu zasuszenia, a wydłużenie fazy laktacji (tzw. laktacja przetrwała lub laktacja przedłużona). Poza sterowaniem czynnikami hormonalnymi o działaniu endokrynnym czy auto/parakrynnym, istnieją też możliwości regulacji poprzez modyfikacje systemu żywienia, racjonalne planowanie hodowli, selekcjonowanie naturalnie występujących, korzystnych polimorfizmów, a także racjonalizację częstotliwości i wielkości pozyskania mleka.

### Piśmiennictwo

1. Baumrucker C. R., Erondou N. E.: Insulin-like growth factor (IGF) system in the bovine mammary gland and milk. *J. Mammary Gland Biol. Neopl.* 2000, 5, 53-64.
2. Capuco A. V., Ellis S. E., Hale S. A., Long E., Erdman R. A., Zhao X., Paape M. J.: Lactation persistency: insights from mammary cell proliferation studies. *J. Anim. Sci.* 2003, 81 Suppl. 3, 18-31.
3. Gajewska M., Motyl T.: IGF-binding proteins mediate TGF- $\beta_1$ -induced apoptosis in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2004, 139, 65-75.
4. Gilmore A. P., Metcalfe A. D., Romer L. H., Streuli C. H.: Integrin-mediated survival signals regulate the apoptotic function of Bax through its conformation and subcellular localization. *J. Cell. Biol.* 2000, 149, 431-445.
5. Greichen R., Liu D. X., Sun Y., Lee K. O., Lobie P. E.: Autocrine Human Growth Hormone inhibits Placental TGF- $\beta$  gene transcription to prevent apoptosis and allow cell cycle progression of human mammary carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2002, 277, 26662-26672.

6. Guinard-Flament J., Saillard Y., Delamaire E., Rulquin H.: Mammary milk accumulation opens tight junctions of the mammary epithelium in a dose dependent manner in dairy cows. *Mat. konf. EAAP/ASAS/COST Workshop*, Bled, Słowenia 2004, s. 25.
7. Heldin C.-H., Miyazano K., ten Dijke P.: TGF- $\beta$  signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997, 390, 465-471.
8. Houston A., O'Connell J.: The Fas signalling pathway and its role in the pathogenesis of cancer. *Curr. Opin. Pharm.* 2004, 4, 321-326.
9. Huynh H., Beamer W., Pollack M., Chan T. W. M. G.: Modulation of TGF- $\beta_1$  gene expression in the mammary gland by insulin-like growth factor-I and octeotide. *Int. J. Oncol.* 2000, 16, 277-281.
10. Kolek O., Gajkowska B., Godlewski M. M., Motyl T.: Molecular mechanism of TGF- $\beta_1$ -induced apoptosis in HC11 mouse mammary epithelial cells (MEC). *Cell. Mol. Biol.* 2001, 47, 197-208.
11. Kolek O., Gajkowska B., Godlewski M. M., Motyl T.: Co-localization of apoptosis-regulating proteins in mouse mammary epithelial HC11 cells exposed to TGF- $\beta_1$ . *Europ. J. Cell Biol.* 2003a, 82, 303-312.
12. Kolek O., Gajkowska B., Godlewski M. M., Motyl T.: Antiproliferative and apoptotic effect of TGF- $\beta_1$  in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. *Comp. Biochem. Physiol. C* 2003b, 134, 417-430.
13. Motyl T., Gajkowska B., Płoszaj T., Wareński P., Skierski J., Zimowska W.: Expression and subcellular redistribution of Bax during TGF- $\beta$ -induced programmed cell death of HC11 mouse mammary epithelial cells. *Cell. Mol. Biol.* 2000, 46, 175-185.
14. Motyl T., Gajkowska B., Wojewódzka U., Wareński P., Rekiel A., Płoszaj T.: Expression of apoptosis-related proteins in involuting mammary gland of sow. *Comp. Biochem. Physiol. B* 2001, 128, 635-646.
15. Mulder K. M.: Role of ras mapks in TGF-beta signaling. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2000, 11, 23-35.
16. Singh K., Dobson J., Farr V., Molenaar A., Stelwagen K.: Milk accumulation decreases expression of genes involved in cell-extracellular matrix communication and initiates apoptosis in the bovine mammary gland. *Mat. konf. EAAP/ASAS/COST Workshop*, Bled, Słowenia 2004, s. 7.
17. Song J., Sapi E., Brown W.: Roles of Fas and Fas ligand during mammary gland remodeling. *J. Clin. Invest.* 2000, 106, 1209-1220.
18. Stefanon B., Colitti M., Gabai G., Knight C. H., Wilde C. J.: Mammary apoptosis and lactation persistency in dairy animals. *J. Dairy Res.* 2002, 69, 37-52.
19. Strange R., Metcalfe T., Thackray L., Dang M.: Apoptosis in normal and neoplastic mammary gland development. *Microscop. Res. Techn.* 2001, 52, 171-181.
20. Tonner E., Allan G., Webster J., Withelaw C. B. A., Flint D. J.: Insulin-like growth factor binding protein-5 potentially regulates programmed cell death and plasminogen activation in the mammary gland. *Mat. konf. Biology of the Mammary Gland*, Tours, Francja 1999, s. 4-18.
21. Yoshimori T.: Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004, 313, 453-458.
22. Wareński P., Motyl T., Ryniewicz Z.: Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. *Small Ruminant Res.* 2001, 40, 279-289.
23. Wilde C. J., Knight C. H., Flint D. J.: Control of milk secretion and apoptosis during mammary gland involution. *J. Mammary Gland Biol. Neopl.* 1999, 4, 129-136.
24. Zarzyńska J., Dymnicki E., Wojewódzka U., Motyl T.: Suppressive effect of GH and IGF-I on TGF- $\beta_1$  expression in bovine mammary gland. *Mat. konf. COST B20 Physiology and Pathology of Mammary Cell Proliferation and Death*, Warszawa 2004, s. 37.
25. Zarzyńska J., Gajewska M., Motyl T.: Effects of hormones and growth factors on TGF- $\beta_1$  expression in bovine mammary gland. *J. Dairy Res.* 2005, 72 (w druku).

Adres autora: lek. wet. Joanna Zarzyńska, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: joansadowska@hotmail.com

### CHALMERS R. M., THOMAS A. L., BUTLER B. A., DAVIES MOREL M. C. G.: Identyfikacja *Cryptosporidium parvum* genotyp 2 u koni. (Identification of *Cryptosporidium parvum* genotype 2 in domestic horses). *Vet. Rec.* 156, 49-50, 2005 (2)

W maju i czerwcu 2002 r. badano świeży kał 20 koni wykorzystywanych do celów rekreacji i 32 koni z lokalnej stadniny na obecność oocyst *Cryptosporidium*. Z 53 próbek kału 33 pochodziły od źrebiąt w wieku poniżej 8 tyg. 2 pochodziły od koni jednorocznych i 17 od koni w wieku ponad 1 roku. Badanie kału przeprowadzono w mikroskopie epifluorescencyjnym, stosując znakowane monoklonalne przeciwciała. W teście PCR badano polimorfizm w obrębie *C. parvum* genotyp 2. Oocysty pasożyta występowały w 2 próbkach kału pochodzącego od źrebiąt w wieku 8 tyg. wychowywanych z matkami. U jednego z tych źrebiąt występowała biegunka.