DOROTA LECHNIAK

Hormon wzrostu (GH) – polimorfizm i wpływ na żeńskie cechy reprodukcyjne

Katedra Genetyki i Podstaw Hodowli Zwierząt Wydziału Zootechnicznego AR, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

Hormon wzrostu (growth hormone, GH) stymuluje rozwój i różnicowanie się wielu typów komórek w organizmie. Do tej pory opublikowano dużą liczbę danych potwierdzających zasadniczą rolę jaką odgrywa GH w regulacji wzrostu masy ciała i produkcji mleka. W rozrodzie zwierząt egzogenny GH wpływa na tempo uzyskiwania dojrzałości płciowej, proces powstawania gamet, częstość pojawiania się ciąż mnogich u bydła, a także produkcję hormonów (np. progesteronu) (2, 5).

Ze względu na zaangażowanie GH w wiele istotnych procesów anabolicznych, gen hormonu wzrostu znajduje się w centrum zainteresowania jako potencjalny marker genetyczny, który może być w przyszłości wykorzystany w selekcji zwierząt.

Polimorfizm długości fragmentów restrykcyjnych (RFLP) dla genu hormonu wzrostu bydła (bGH) i świń (pGH). Intensywny rozwój technik molekularnych notowany w ostatnich latach umożliwił szerokie ich wykorzystanie zarówno w badaniach naukowych jak i hodowli zwierząt (4). Poszukiwanie markerów genetycznych dla cech ilościowych przyniosło m.in. efekt w postaci wykrycia mutacji punktowych w sekwencji genów. Efektem tych mutacji jest polimorfizm na poziomie DNA wykrywany przy użyciu różnych enzymów restrykcyjnych. Mutacje punktowe zidentyfikowano w obrębie genu GH zarówno u bydła (20, 27, 32) jak i świń (16). Najlepiej znana jest mutacja opisana przez Seavey i wsp. (27) polegająca na zmianie kodonu CTG na GTG w V eksonie, co powoduje zamianę leucyny na walinę w 127 aminokwasie tego polipeptydu. W wyniku zaniku istniejącego miejsca restrykcyjnego dla enzymu Alu I warianty te są wykrywane metodą PCR-RFLP (21). Opisano trzy formy genotypowe w locus GH obserwowane po trawieniu enzymem Alu I: homozygotyczne (Leu/Leu, Val/Val) oraz heterozygotyczną (Leu/Val).

Efektem identyfikacji mutacji punktowych w sekwencji genu hormonu świni było opracowanie prostych metod genotypowania zwierząt przy użyciu różnych enzymów restrykcyjnych m.in. Hae II i Msp I (16) dla mutacji w II intronie czy Hha I (13) dla mutacji w II eksonie pGH. Dotychczasowe badania wykazują zróżnicowanie frekwencji poszczególnych alleli i genotypów pomiędzy analizowanymi rasami świń (13, 17).

Charakterystyka badań nad związkiem polimorfizmu genu GH z niektórymi cechami produkcyjnymi. Dotychczasowe badania wykazały dużą zmienność częstotliwości występowania poszczególnych genotypów w locus GH u różnych ras bydła (tab. 1). Ponadto analiza związku pomiędzy genotypem GH a cechami produkcyjnymi wskazuje na to, że rasy bydła mlecznego o wysokiej ostatecznej masie ciała (np. HF) posiadają najwyższą częstotliwość allelu Leu podczas gdy rasy o niższej masie ciała (np. Jersey) wykazują najwyższą frekwencję allelu Val w tym locus. Sugeruje się, że locus GH albo geny z nim sprzężone decydują o ostatecznej masie ciała i tempie wzrostu i co się z tym wiąże o wyższej wydajności mlecznej (21). Badania buhajów wykorzystywanych w inseminacji wykazały istotny związek między poszczególnymi genotypami w locus GH a poziomem hormonu w krwi obwodowej (25). Ostatnie doniesienia Zwierzchowskiego (36) wskazują na istnienie wysokiej korelacji między genotypem w locus GH a masą ciała oraz pobraniem i wykorzystaniem paszy u bydła.

Tab. 1. Frekwencje genotypów dla genu GH u bydła

Rasa	Genotypy			Źródło
	LEU/LEU	LEU/VAL	VAL/VAL	
HF	0,85	0,15	0,0	21
HF	0,7	0,29	0,1	18
Guernsey	0,83	0,17	0,0	21
Ayrshire	0,59	0,41	0,0	21
Jersey	0,19	0,31	0,12	21
ncb+HF	0,438	0,343	0,219	36

Również u świń stwierdzono związki pomiędzy cechami produkcyjnymi i genotypami zwierząt w locus GH, takimi jak np. otłuszczenie tuszy (17) i powierzchnia oka polędwicy (3). Jednocześnie wykazano, że w niektórych przypadkach brak jest jakichkolwiek związków cech produkcyjnych i genotypu GH np. u mieszańców dzika z rasą Pietrain (17).

Funkcje GH w procesie wzrostu pęcherzyków jajnikowych i oogenezy. Hormon wzrostu odgrywa również kluczową funkcję w procesach rozrodu zwierząt, a szczególnie rozwoju gonad, produkcji gamet i rozwoju zarodka (5). Ostatnie lata przyniosły duże zainteresowanie badaczy na świecie rolą GH w regulacji procesu wzrostu pęcherzyków jajnikowych, przebiegu oogenezy i dojrzewaniu oocytów zarówno *in vivo* jak i *in vitro*.

Yoshimura i wsp. (35) sugerują dwa sposoby oddziaływania GH na jajnik: poprzez własne receptory, albo poprzez stymulację produkcji IGF-I w jajniku. Zespół ten stwierdził, że GH stymuluje wzrost pęcherzyków, tempo dojrzewania oocytów, a także produkcję IGF-I w jajnikach królika *in vitro*, co wskazuje na obecność jego receptorów na powierzchni jajnika. Wykazano również udział hormonu wzrostu we wspomaganiu działania hormonów gonadotropowych. Ponadto przy braku gonadotropin, zainicjowuje on dojrzewanie oocytów królika w pęcherzykach jajnikowych oraz stymuluje produkcję estrogenów w jajniku (34).

Podawanie jałówkom egzogennego hormonu wzrostu spowodowało wzrost liczby pęcherzyków jajnikowych w grupie o średnicy 2-5 mm (6, 20). Jednocześnie nie zaobserwowano żadnego wpływu na długość cyklu płciowego, fazy pęcherzykowej czy fazy ciałka żółtego. Podwyższona liczba pęcherzyków była skorelowana z koncentracją hormonu wzrostu, czynnika insulinopodobnego (IGF-I) oraz insuliny we krwi. Ponadto stwierdzono, że GH stymuluje produkcję estradiolu (E_2) przez komórki bydlęcej granulozy (28). Gong i wsp. (7) wykazali, że podawanie jałówkom egzogennego GH znacznie zwiększyło liczbę owulowanych oocytów w wyniku zabiegu superowulacji, jak i liczbę odzyskanych i przeniesionych zarodków. Stwierdzono również mniejszą częstotliwość pojawiania się cyst pęcherzykowych obniżających reakcję jajników na podawane hormony. Działając za pośrednictwem IGF-I, hormon wzrostu wpływa na liczbę receptorów LH i produkcję progesteronu (26), ponadto może stymulować produkcję IGF-I w jajniku i wspomagać proces wzrostu pęcherzyków (14). Wykazano, że GH bezpośrednio oddziałuje na produkcję IGF-I przez komórki granulozy, który to efekt sumuje się z działaniem estradiolu i FSH (9). Wyniki najnowszych eksperymentów dowodzą obecności mRNA receptora GH na komórkach granulozy, pęcherzykach jajnikowych oraz oocytach (12).

U świni stwierdzono wpływ hormonu wzrostu na funkcje wydzielnicze granulozy *in vitro*, poprzez stymulację produkcji IGF-I i działanie podobne do FSH i estradiolu (9). Podobnie jak u bydła, podawanie egzogennego GH wpływa na zwiększenie liczby pęcherzyków jajnikowych o średnicy od 1 do 3,9 mm przy jednoczesnym wzroście poziomu IGF-I (30). Kamiński i Przała (14) sugerują, że GH wpływa na syntezę i uwalnianie czynnika IGF-I w jajniku. Głównym źródłem IGF-I jest prawdopodobnie warstwa ziarnista. GH dodatkowo intensyfikuje łączenie się IGF-I z jego własnymi receptorami w komórkach tej warstwy.

Funkcje hormonu wzrostu w procesie dojrzewania oocytów zwierząt gospodarskich. Produkcja zarodków w warunkach *in vitro* (IVM/IVF/IVC) szczególnie u bydła jest ważną biotechniką wspomagającą rozród u tego gatunku. Metoda ta ma szczególne znaczenie w przypadku wyjątkowo cennych samic, gdyż w powiązaniu z przyżyciową metodą pozyskiwania niedojrzałych oocytów pozwala na znacznie lepsze wykorzystanie potencjału rozrodczego zwierząt (29). Podsumowanie wyników wieloletnich badań dotyczących opracowania optymalnych warunków produkcji zarodków ssaków *in vitro* wykazało, że nadal jakość zarodków uzyskanych *in vivo* jest wyższa od jakości zarodków wyprodukowanych *in vitro*, szczególnie biorąc pod uwagę przydatność zarodków do przechowywania i manipulacji (31). Różnice te są dostrzegalne przede wszystkim na poziomie komórkowym, w ultrastrukturze i metabolizmie zarodka. Czynnikami, które w ostatnim czasie cieszą się coraz większym zainteresowaniem badaczy, odgrywającymi zasadniczą rolę w procesach rozwoju zarodka i jego implantacji są różne czynniki wzrostu (15, 22). Do tej pory wykazano dodatni wpływ wybranych czynników wzrostu (np. IGF-I, GH) na jakość wyprodukowanych zarodków (8). Palma i wsp. (23) potwierdzili hipotezę, że IGF-I wraz z rujową surowicą bydlęcą i komórkami granulozy pozytywnie oddziałują na potencjał rozwojowy zarodków *in vitro*. Ponadto stwierdzono korzystny wpływ IGF-I na proces ekspansji komórek pęcherzykowych oraz dojrzewania jądra oocytów, przy czym znacznie lepsze efekty przyniosło jednoczesne użycie dwóch czynników wzrostu: epidermalnego czynnika wzrostu (EGF) i IGF-I. Potwierdzono dotychczasowe przypuszczenia, że czynniki te nie oddziałują na nagie oocyty, co jednocześnie dowodzi zasadniczego znaczenia komórek pęcherzykowych w procesie dojrzewania oocytów (19).

Dotychczasowe badania wykazały istotny wpływ hormonu wzrostu na proces dojrzewania oocytów *in vitro*. U bydła GH znacznie przyspiesza proces dojrzewania oocytów *in vitro* nie zwiększając jednak frakcji komórek uzyskujących stadium metafazy drugiej mejozy (MII) (10, 11). Stymuluje on dojrzewanie *in vitro*, ekspansję komórek pęcherzykowych, a także wpływa korzystnie na rozwój zarodkowy. Sugeruje się, że GH może mieć pozytywny wpływ na tempo przebiegu pierwszego podziału mejotycznego i kinetykę wyrzucania pierwszego ciałka kierunkowego (33). Oocyty, w których pierwsze ck zostało wyrzucone między 16 a 20 godziną procesu dojrzewania *in vitro*, po zapłodnieniu wykazywały lepszy potencjał rozwojowy (poziom dzielących się zygot i blastocyst). Podobne wyniki uzyskał zespół Arollto (1). Efektem iniekcji egzogennego GH, od dawczyń pozyskano większą liczbę prawidłowych morfologicznie oocytów zdatnych do IVM. Również większa część oocytów w tym eksperymencie osiągnęła stadium MII (24).

Podsumowanie

Wyniki dotychczasowych badań wskazują na kluczową funkcję hormonu wzrostu w procesach wzrostu pęcherzyków oraz wzrostu i dojrzewania oocytów *in vivo* i *in vitro*. Wykazane do tej pory zależności między poszczególnymi genotypami w locus GH, a poziomem hormonu we krwi buhajów, produkcją mleka (bydło) i przyrostami masy ciała (bydło i świnie) są dowodem ich związku z konkretnymi cechami ilościowymi i jednocześnie potencjalnej roli locus GH jako markera genetycznego. Liczne funkcje GH w regulacji funkcji jajników i procesie dojrzewania oocytów u zwierząt gospodarskich sprawiają, że znajduje się on w centrum zainteresowania jako potencjalny marker genetyczny dla cech reprodukcyjnych.

Piśmiennictwo

1. *Arlotto T., Schwarz J. L., First N. L., Leibfried-Rutledge M. L.*: Theriogenology 45, 943, 1996.
2. *Burton J. L., McBride B. W., Block E., Glimm D. R., Kenelly J. J.*: Can. J. Anim. Sci. 74, 167, 1994.
3. *Casas-Carrilo E., Prill-Adams A., Price S. G., Kirkpatrick B. W.*: 5th World Cong Genet. Appl. Livestock Prod. August 7-12 Guelph, 21, 272, 1994.
4. *Charon K. M.*: Zesz. Nauk. PTZ 33, 65, 1997.
5. *Gac F. L., Blaise O., Fostier A., Le Bail P. Y., Loir M., Mourot B., Weil C.*: Fish Physiology and Biochemistry, 11, 219, 1993.
6. *Gong J. G., Bramley T., Webb R.*: J. Reprod. Fert. 97, 247, 1993.
7. *Gong J. G., Wilmut I., Bramley T. A., Webb R.*: Theriogenology 45, 611, 1996.
8. *Herrler A., Lucas-Hahn A., Niemann H.*: Theriogenology 37, 1213, 1992.
9. *Hsu C. J. U., Hammond J. M.*: Endocrinology 121, 1343, 1987.
10. *Izadyar F., Colenbrander B., Bevers M. M.*: Theriogenology 4, 279, 1996.
11. *Izadyar F., Colenbrander B., Bevers M. M.*: Mol. Reprod. Dev. 45, 372, 1996.
12. *Izadyar F., Van Tol H. T. A., Colenbrander B., Bevers M. M.*: Molec. Reprod. Dev. 47, 175, 1997.
13. *Jiang Z. H., Rottmann O. J., Pirchner F.*: J. Anim. Breed. Genet. 113, 553, 1996.
14. *Kamiński T., Przała J.*: Postępy Biol. Kom. 21, 79, 1994.
15. *Kaye P. L.*: Rev. Reprod. 2, 121, 1997.
16. *Kirkpatrick B. W.*: Anim. Genet. 23, 180, 1992.
17. *Knorr C., Moser G., Muller E., Geldermann H.*: Anim. Genet. 28, 124, 1997.
18. *Lee B. K., Lin G. F., Crooker B. A., Murtaugh M. P., Hansen L. B., Chester-Jones H.*: J. Dairy Sci. abstr. 76, 149, 1993.
19. *Lorenzo P. L., Illera M. J., Illera J. C., Illera M.*: J. Reprod. Fert. 101, 697, 1994.
20. *Lucy M. C., Savio J. D., Badinga L., La Sota R. L., Thatcher W. W.*: J. Anim. Sci. 70, 3615, 1992.
21. *Lucy M. C., Hauser S. D., Eppard P. J., Kivi G. G., Clark J. H., Bauman D. E., Collier R. J.*: Domest. Anim. Endocrinol. 10, 325, 1993.
22. *Martal J., Chene N., Camous S., Huynh L., Lantier F., Hermier P., L'Haridon R., Charpigny G., Charlier M., Chaouat G.*: Reprod. Fert. Dev. 9, 355, 1997.
23. *Palma G. A., Muller M., Brem G.*: J. Reprod. Fert. 110, 347, 1997.
24. *Pavlok A., Kontecka L., Krejci P., Slavik T., Cerman J., Slaba J., Dorn D.*: Anim. Reprod. Sci. 41, 183, 1996.
25. *Schlee P., Graml R., Schallenberger E., Schams D., Rottmann O., Olbrich-Bludau A., Pirchner F.*: Theor. Appl. Genet. 88, 497, 1994.
26. *Schemm S. R., Deaver D. R., Griel L. C., Muller L. D.*: Biol. Reprod. 42, 815, 1991.
27. *Seavey B. K., Singh R. N. P., Lewis U. J., Geschwind I. I.*: Bioch. Biopys. Res. Comm. 43, 189, 1971.
28. *Sirotkin A. V.*: Anls. Endocrinol 57, 219, 1996.
29. *Smorąg Z.*: Zesz. Nauk. PTZ 33, 95, 1997.
30. *Spicer L. J., Klindt J., Buonomo F. C., Maurer R., Yen J. T., Echternkamp S. E.*: J. Anim. Sci. 70, 3149, 1992.
31. *Thompson J. G.*: Reprod. Fertil. Dev. 9, 341, 1997.
32. *Unanian M. M., DeNise S. K., Zhang H. M., Ax R. L.*: J. Anim. Sci. 72, 2203, 1994.
33. *Westerlaken van der L. A. J., Schans van der A., Eyestone W. H., de Boer H. A.*: Theriogenology 42, 361, 1994.
34. *Yoshimura Y., Iwashita M., Nakamura Y., Adachi T., Koyama N., Takeda Y.*: Fertil. Steril. 59, 917, 1994.
35. *Yoshimura Y., Iwashita M., Karube M., Oda T., Akiba M., Shiokawa S., Ando M., Yoshinaga A., Nakamura Y.*: Endocrinology 135, 887, 1994.
36. *Zwierzchowski L., Siadkowska E., Kurył J., Dymnicki E., Łukaszewicz M., Grochowska R.*: Prace Mat. Zoot. Zesz. Specj. 7, 89, 1997.

Adres autora: dr Dorota Lechniak, ul. Wołyńska 33, 60-637 Poznań

EL-KOMMONEN C., SIHVONEN L., PEKKANEN K., RIKULA V., NUOTIO L.: Epidemia nosówki w Finlandii u psów szczepionych. (Outbreak of canine distemper in vaccinated dogs in Finland). Vet. Rec. 141, 380-383, 1997 (15)

W Finlandii przeciwko nosówce szczepi się psy w wieku 3, 4 i 12 miesięcy i powtarza szczepienie w odstępach 2- letnich. Zachorowania na nosówkę pojawiły się ponownie po 16 latach nieobecności. W okresie lipiec 1994 r. październik 1995 r. zachorowało 5000 psów, przy czym kliniczne rozpoznanie choroby potwierdzono odczynem immunofluorescencji w 365 przypadkach na 3649 próbek badanych komórek nabłonka spojówek lub układu rozrodczego. Wśród objawów klinicznych obserwowano gorączkę, zapalenie spojówek, utratę łaknienia, zaburzenia oddechowe i ze strony przewodu pokarmowego. Głównie (631 przypadków) chorowały psy w wieku od 3 do 24 miesięcy życia. W tej grupie 487 psów było szczepione jednorazowo, 351 poddano całej procedurze szczepień. Badaniom serologicznym poddano 4678 surowic pochodzących od zdrowych szczepionych psów pobranych w okresie szczytu i zejścia epidemii. Spadek liczby psów młodych o mianie SN <1:8 przebiegał równolegle ze spadkiem nasilenia choroby i jej końcem przypadającym na wiosnę i lato 1995 r. Uważa się, że obniżenie odporności populacji w okresie 1990-1994 r. przyczyniło się do wystąpienia epidemii nosówki latem 1994 r.

G.

HARRUS S., KASS P. H., KLEMENT E., WANER T.: Monocytarna erlichioza psów: badanie retrospektywne 100 przypadków oraz badania epidemiologiczne wskaźników prognostycznych choroby. (Canine monocytic ehrlichiosis: a retrospective study of 100 cases, and an epidemiological investigation of prognostic indicators for the disease). Vet. Rec. 141, 360-363, 1997 (14)

Badaniem objęto 100 hospitalizowanych psów w latach 1990-1994, u których stwierdzono zarażenie *Ehrlichia canis* potwierdzone badaniem metodą immunofluorescencji pośredniej (miano pozytywne >1:40). W leczeniu stosowano doksycyklinę w dawce dziennej 10 mg/ kg przez conajmniej 3 tygodnie łącznie z iniekcją propionianu imidokarbu w dawce 5 mg/ kg, dwukrotnie w dniu pierwszej wizyty oraz po 2 tygodniach. Rok lub ponad rok przeżyły 42 psy, 17 psów padło w ciągu roku od momentu zachorowania. Z 51 psami stracono kontakt. Do najczęściej stwierdzanych objawów należała depresja, letarg, powiększenie węzłów chłonnych, gorączka, utrata łaknienia, bladość błon śluzowych, krwawienie z nosa. Wśród zmian hematologicznych dominowała trombocytopenia, niedokrwistość głównie monocytarna normochromatyczna oraz limfopenia. Wystąpienie ostrej niedokrwistości, ostrej leukopenii, pancytopenii oraz tendencji do krwotoków z jamy nosowej, zwłaszcza u owczarków, rokuje niepomyślnie w monocytarnej erlichiozie.

G.