

TADEUSZ BAROWICZ, TADEUSZ GREGA, ZYGMUNT EWY

Instytut Zootechniki w Krakowie

CZYNNIKI WARUNKUJĄCE WZROST ZWIERZĄT — SOMATOMEDYNA

Procesy wzrostu w naukach zootechnicznych definiowane są jako powiększenie masy i ciężaru ciała zwierzęcia w jednostce czasu. Powiększenie to odbywa się drogą namnażania liczby komórek, wzrostu ich objętości, lub gromadzenia się substancji niecytoplazmatycznych (np. tłuszczu). Procesy te sterowane są oddziaływaniem na żywy organizm szeregu czynników. Do najważniejszych z nich można zaliczyć różnice genetyczne, żywienie, warunki klimatyczne, płeć oraz ogólne warunki utrzymania i pielęgnacji.

Młode zwierzę, aby mogło w okresie wzrostu w pełni rozwinąć swoje możliwości dziedziczne musi być racjonalnie żywione. Aby zaspokoić potrzeby wzrostowe powinna być podawana pasza w odpowiedniej ilości oraz o dobrej strukturze.

Pierwszym bowiem pokarmem zwierząt jest mleko. Zaspokaja ono w całości zapotrzebowanie w początkowym okresie życia, z wiekiem jednak potrzeby pokarmowe wzrastają i muszą być zaspokajane paszami podawanymi przez hodowcę. Poprzez stosowanie różnych sposobów żywienia hodowca może skrócić okres wzrostu, przyspieszając tym samym dojrzałość płciową.

U nowonarodzonych zwierząt, czynniki fizyczne takie jak temperatura otoczenia oraz światło wywierają różnorodny wpływ na organizm zwierzęcia. Młode bowiem zwierzęta, w początkowym okresie życia posiadają w pełni jeszcze nie rozwinięty system termoregulacji. Są więc wrażliwe na ostre zmiany temperatury. W niższych temperaturach obserwuje się zwiększone potrzeby na utrzymanie stałej ciepłoty ciała, natomiast w wyższej spadek łaknienia, co w konsekwencji pociąga za sobą zahamowanie wzrostu ciała. Innym czynnikiem oddziałującym na wzrost jest światło słoneczne. Powszechnie znany jest wpływ na wytwarzanie się w skórze pod wpływem promieni słonecznych witaminy D. Światło słoneczne ponadto korzystnie wpływa na wzrost i rozwój gonad, przemianę materii oraz gospodarkę hormonalną ustroju poprzez wpływ na przysadkę mózgową, szyszynkę oraz układ neurosekrecyjny podwzgó-

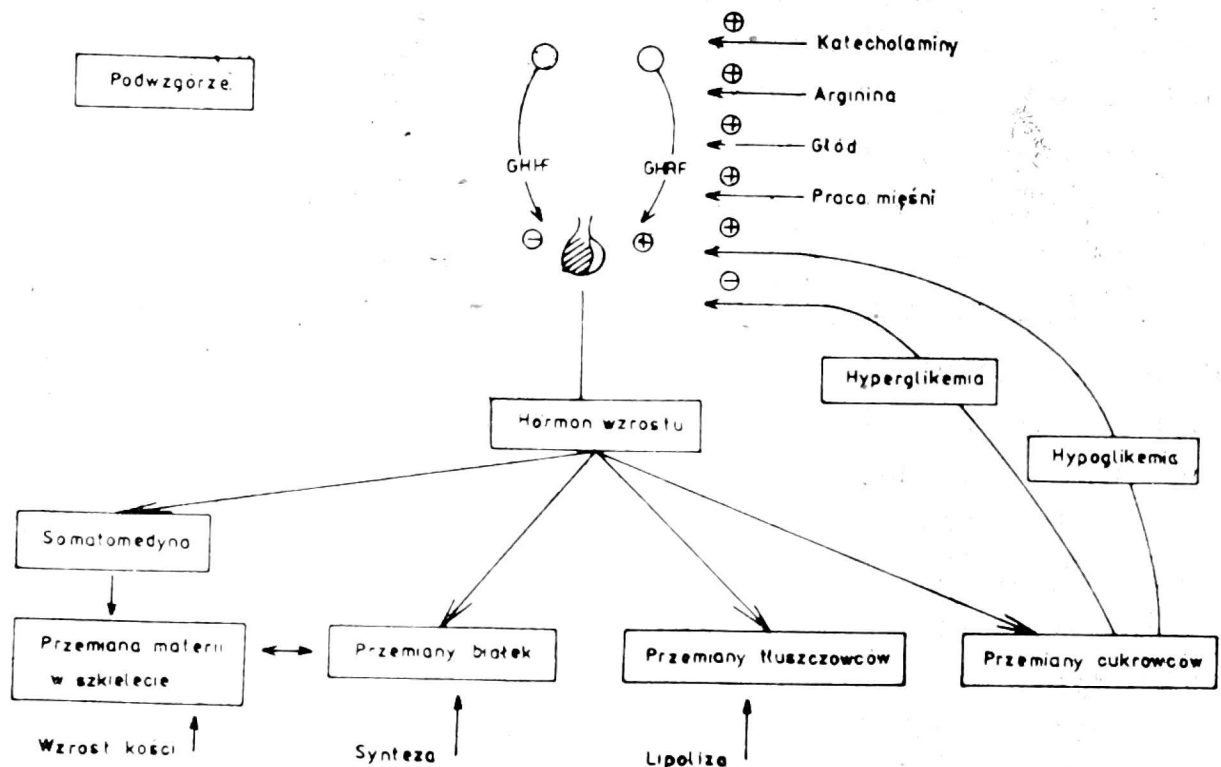
rza. Ten ostatni oddziałuje obwodowo na funkcjonowanie takich gruczołów wewnętrznego wydzielania jak tarczyca, nadnercza i gonady.

Wśród hormonów, bezpośrednią rolę w procesach wzrostu odgrywają hormony podwzgórza: hormon uwalniający hormon wzrostu (GH-RH) oraz hormon hamujący uwalnianie hormonu wzrostu (GH-IF) inaczej zwany somatostatyną, które regulują sekrecję hormonu wzrostu (GH). Mechanizm działania i uwalniania hormonu wzrostu przedstawiony został na rys. 1. Hormon ten wywiera wpływ na wzrost szkieletu oraz na przemianę białkową, tłuszczową i cukrową w ustroju. Zmniejszone wydzielanie hormonu wzrostu w początkowym okresie życia wywołuje karłowatość, natomiast nadmierne wydzielanie powoduje nienormalny wzrost, tzw. gigantyzm.

Proces tworzenia szkieletu kostnego trwa przez cały okres życia płodowego i nie kończy się z momentem urodzenia. Wiele bowiem składników szkieletu kostnieje nawet jeszcze po osiągnięciu dojrzałości płciowej. Proces kostnienia rozpoczyna się w obrębie przyszłego trzonu kości. Mianowicie, komórki warstwy wewnętrznej chrząstki przekształcają się w osteoblasty i osteoklasty, a chrząstka w okostną. W istocie międzykomórkowej części powierzchniowej chrząstki zjawiają się złogi mineralne, komórki chrząstkowe wyrodnienia i zanikają, a wokół osteoblastów wytwarza się osseina, w której odkładają się związki mineralne. Jest to proces kostnienia chrząstki. Nieco później rozpoczyna się proces kostnienia śródchrząstkowego. Polega on na tym, że w obrębie trzonu i obu końców pojawiają się ośrodki kostnienia, w których istocie międzykomórkowej odkładają się związki mineralne, a komórki chrząstki zanikają. Procesy te dotyczą zarówno wzrostu kości na grubość jak i na długość. Ponadto między trzonem a nasadami kości zachowuje się przez długi okres czasu po urodzeniu cienka chrząstka nasadowa, która rozrasta się nieprzerwanie, w okresie jednak dojrzewania płciowego jej zdolność twórcza zanika i kości przestają rozrastać się na długość. Hormony gonadowe bowiem pobudzają różnicowanie się komórek kostnych, co w rezultacie doprowadza do zatrzymania wzrostu. Ponadto powodują one zatrzymanie P i Ca w ustroju na skutek odkładania ich w kośćcu. U osobników więc z nadczynnością gonad występuje zbyt wczesne zahamowanie wzrostu.

Działanie hormonu wzrostu na chrząstki nasady kości, w kierunku pobudzania ich do wzrostu odbywa się pośrednio, poprzez występujący we krwi czynnik o aktywności sulfurylującej [22]. Czynnik ten, odpowiedzialny *in vivo* za przebieg szeregu procesów metabolicznych, a pobudzający *in vitro* wbudowywanie się siarczanów do chondroityny chrząstek nazwany został somatomedyną [7].

MECHANIZM UWALNIANIA I DZIAŁANIA HORMONU WZROSTU



Rys. 1

W niniejszym opracowaniu przedstawiono współczesne poglądy na temat powstawania, właściwości i roli somatomedyny w procesach wzrostu. Ponadto omówiono metody oznaczania tego peptydu w osoczu krwi, a także możliwości praktycznego jego zastosowania dla celów selekcji zwierząt gospodarskich.

Właściwości somatomedyny

Somatomedyna występuje u zwierząt kręgowych, nie obserwowano jej występowania natomiast u bezkręgowców [26]. Początkowo obecność somatomedyny stwierdzona została w wątrobie, nerkach i mięśniach. Ostatnio natomiast przyjmuje się, że głównym miejscem jej syntezy jest jednak wątroba, co zostało potwierdzone za pomocą perfuzji tego narządu, lub podczas hodowli *in vitro* komórek wątrobowych [8, 17]. Somatomedyna jest peptydem, który we krwi ulega agregacji lub łączy się z innymi białkami, tworząc kompleksy o ciężarze cząsteczkowym ok. 90×10^3 daltonów [31]. Przy oczyszczaniu natomiast osocza krwi w kwaśnym środowisku (pH 2), uzyskuje się pojedyncze peptydy, których ciężar waha się między $6-7 \times 10^3$ daltonów. Dalsza izolacja peptydów doprowadziła do uzyskania szeregu związków o właściwościach somatomedyny. Uzyskano między innymi somatomedynę A₁ i A₂ jako obojętne peptydy o znanym składzie aminokwasowym [10], somatomedynę B,

kwaśny peptyd którego ciężar cząsteczkowy wynosi $4-5 \times 10^3$ daltonów [28], natomiast skład aminokwasowy jest nieznan [10]. Istnieje ponadto somatomedyna C i P [34]. W przypadku somatomedyny C, Rinderknecht i Humbel [21] wykazali, że kolejność jej 31 ostatnich aminokwasów zbliżona jest do budowy łańcucha B insuliny.

Syntezę somatomedyny stymulują następujące czynniki: hormon wzrostu, insulina [35], prolaktyna [9] i laktogen łożyskowy [14], inhibitorami zaś są glikokortykoidy i duże dawki estrogenów [35]. Również głodzenie wpływa ujemnie na aktywność somatomedyny [19, 27].

Biologiczne działanie somatomedyny polega na pobudzaniu syntezy RNA i DNA w chrząstkach, stymulacji transportu aminokwasów i syntezy białek w mięśniach, zwiększaniu glikolizy oraz nasilaniu procesów lipolizy w tłuszczach [35]. Osocze zawierające somatomedynę, przede wszystkim stymuluje inkorporację $^{35}\text{SO}_4$, ^{14}C lub ^3H leucyny do kompleksu białkowo-cukrowego, ^3H urydyny do kwasu rybonukleinowego i ^3H tyminy do kwasu dezoksyrybonukleinowego w tkance chrzęstnej [23]. Stymulacja wcielania tymidyny do DNA występuje później niż inne efekty i do osiągnięcia wyraźnych różnic niezbędne jest 24-godzinna inkubacja. Biologiczne działanie somatomedyny nie ogranicza się wyłącznie do chrząstek. Wpływa ona również na wbudowywanie się leucyny do mięśni i białek przepony oraz oddziałuje na tkankę tłuszczową podobnie jak insulina [24], powodując spadek poziomu wolnych kwasów tłuszczowych i glicerolu w surowicy oraz stymuluje glikolizę. Przyspiesza również wzrost komórek He La [25] (komórki w hodowli tkankowej otrzymane pierwotnie z raka szyjki macicznej).

Somatomedyna zachowuje swoje właściwości sulfurylujące przez długi okres czasu przechowywania w temperaturze -20°C . Również podgrzewanie jej przez okres 15 min. do temp. $+60^\circ\text{C}$ nie wpływa ujemnie. Czynniki ten traci swoje właściwości dopiero po ogrzaniu do 80°C . Ponadto somatomedyna jest rozkładana przez proteinyazy. Półokres trwania somatomedyny w krwioobiegu jest stosunkowo krótki i w zależności od ciężaru cząsteczkowego, dla peptydów niskocząsteczkowych określony został na 8 min. natomiast dla związków wysokocząsteczkowych na 2-4 godz. [3]. Jednostką aktywności somatomedyny jest ilość czynnika sulfurylującego w 1 ml standardowej surowicy, którą uzyskuje się od zdrowych, wyrosniętych ludzi obu płci.

Przyjmuje się, że poziom somatomedyny we krwi jest stały w ciągu doby [6], a jej fizjologiczne działanie polega prawdopodobnie na ciągłej stymulacji procesów wzrostowych w odróżnieniu od hormonu wzrostu, którego wydzielanie się podlega wahaniom w ciągu doby. Ten nieregularny sposób wydzielania hormonu wzrostu wydaje się być słabo przy-

stosowany do modulowania wolno postępujących procesów, niezbędnych do właściwego wzrostu komórek.

Autorami kluczowej pracy dotyczącej somatomedyny byli Salmon i Daughaday [22], w kraju natomiast pierwsze opracowanie na ten temat ukazało się w Endokrynologii Polskiej w 1973 [20].

Metody oznaczania somatomedyny

Somatomedynę w osoczu krwi oznacza się głównie metodami biologicznymi aczkolwiek czynione są ostatnio próby opracowania metod radiokompetycyjnych i radioimmunologicznych. W przypadku metod biologicznych są one oparte na wbudowywaniu się $^{35}\text{SO}_4$ do chondroityny chrząstki, lub ^3H -tymidyny do DNA chondriocytów chrząstki (tab.).

Tabela

Biologiczne metody oznaczenia somatomedyny

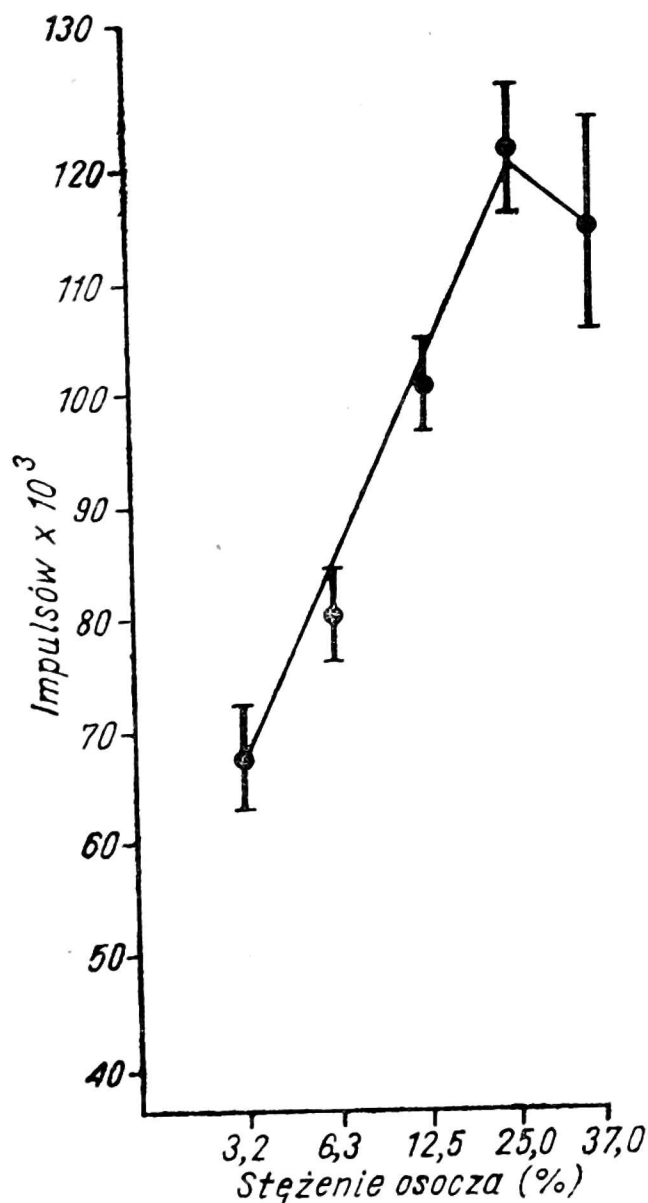
| Autor | Zwierzę | Izotop | Indeks precyzji (λ) | Zakres stężenia osocza krwi (w %) dające liniową zależność |
|-------------------------------|----------------------|------------------------|-------------------------------|--|
| Salmon i Daughaday [22] | szczur bez przysadki | $^{35}\text{SO}_4$ | $\pm 0,26$ | 2,5—17 |
| Yde [32] | szczur normalny | $^{35}\text{SO}_4$ | $\pm 0,20$ | 5—15 |
| Hall [11] | zarodek kurczęcia | $^{35}\text{SO}_4$ | $\pm 0,20$ | 5—60 |
| van den Brande i Du Caju [33] | świnia | $^{35}\text{SO}_4$ | $\pm 0,15$ | 5,6—45 |
| Spencer i Taylor [29] | świnia | $^{35}\text{SO}_4$ | $\pm 0,14$ | 3—50 |
| Ashton i Francis [1] | królik | ^3H -tymidyna | $\pm 0,35$ | 2,5—10 |

Do oznaczania wbudowywania się $^{35}\text{SO}_4$ do chrząstki zastosowanie znalazły: chrząstka szczura [4, 5, 32], miednica zarodka kurczęcia [11] oraz chrząstka żebra prosięcia [29, 33]. W metodzie podanej przez Daughadaya i wsp. [4] oraz Collinsa i wsp. [5] materiał doświadczalny stanowiły hypofizektomizowane szczura, ubijane w wieku 21 dni. Po ubiciu pobiera się wstępnie oczyszczoną z kości i tkanek miękkich chrząstkę z żebra i kraje na kawałki o wymiarach $3 \times 0,5 \times 0,5$ mm. Inkubację chrząstek przeprowadza się w 4 różnych stężeniach testowanej surowicy wraz ze znakowanym ^{35}S siarczanem sodu. Proces ten przebiega w temp. 37°C przez okres 24 godz. Inkubację przerywa się przez podgrzewanie do 80°C próbek a następnie wymywa się pozostałości niewbudowanych

radioaktywności. Pomiar aktywności przeprowadza się na liczniku do płynnej scyntytacji po uprzednim określeniu suchej masy chrząstki i jej zhydrolizowaniu. Wychwył ^{35}S przez chrząstkę wyraża się liczbą impulsów na 1 mg chrząstki.

Ze względu na kłopoty techniczne, związane z uzyskiwaniem znacznej liczby szczurów z usuniętą przysadką, Yde [32] jako materiał doświadczalny użył szczury normalne. Zwierzęta ubija się w wieku 21—38 dni, a następnie pobiera chrząstkę z żebra, która następnie poddawana jest uprzednio opisanej procedurze.

Znacznie mniej kłopotliwą metodą jest oznaczanie somatomedyny przy użyciu chrząstki z miednicy 11-dniowego zarodka kurczęcia [11]. W metodzie tej, po godzinnej inkubacji wstępnej oraz po 6-godzinnej inkubacji wraz ze znakowanym siarczanem, dokładnie wypłukane zawiązki miednicy trawi się pronazą lub papainą, po czym mierzona jest radioaktywność wbudowanej siarki. Przykładową krzywą wbudowywania się ^{35}S do zawiązków miednicy kurczęcia w pięciu różnych stężeniach surowicy przedstawiono na rys. 2. Wyniki wyraża się w ilości impulsów/min.



Rys. 2.

Obok szczura i kurczęcia, do ilościowego oznaczania somatomedyny służy również chrząstka pobrana od 140—160-dniowego prosięcia [33]. Chrząstkę pobiera się z końca najniższego żebra, a następnie po oczyszczeniu z resztek tkanek miękkich dzieli się na kawałki o średnicy i grubości 2 mm. Wstępna inkubacja przeprowadzana jest w temperaturze 37°C przez 24 godz., zaś właściwa inkubacja w tych samych warunkach przez 46 godz. Inkubację przeprowadza się przeważnie w 4 różnych stężeniach osocza. Po wypłukaniu i trawieniu chrząstki 90% kwasem mrówkowym oznaczona jest radioaktywność, a wyniki wyrażane są w ilości jednostek somatomedyny na ml osocza. Metoda ta została zminiaturyzowana przez Spencera i Taylora [29] i umożliwia oznaczenie somatomedyny w 0,2—0,5 ml osocza krwi.

Ashton i Francis [1] opracowali metodę oznaczania somatomedyny na podstawie wbudowywania się do chondriocytów królika ^3H -tymidyny. Chondriocyty uzyskuje się przez trawienie chrząstki z trypsyną, a następnie przeprowadza się przez 48 godz. inkubację ich w 37°C wraz z ^3H -tymidyną. Aktywność somatomedyny w tym przypadku wyrażana jest ilością impulsów na $4\text{—}6 \times 10^6$ chondriocytów.

Biologiczne metody oznaczania somatomedyny, mimo dużej specyficzności i wysokiej czułości, ze względu na uciążliwość i długotrwałość oznaczeń zastępowane są nowoczesnymi metodami radiokompetycyjnymi. Przyczyniło się do tego opracowanie metod otrzymywania wysoce oczyszczonej somatomedyny ludzkiej. Zasada oznaczeń polega na konkurencyjnym wiązaniu się znakowanej ^{125}J oraz nie znakowanej somatomedyny przez skrawki błon łożyska ludzkiego [30, 36], komórki wątroby szczura [18], czy fibroblasty [37]. Skrawki wymienionych narządów są źródłami receptorów dla somatomedyny. Metody radiokompetycyjne, ze względu na kosztowność są stosowane tylko w nielicznych laboratoriach badawczych.

Perspektywy praktycznego zastosowania somatomedyny w hodowli i klinice

W ostatnich latach przeprowadzono szereg prac, których celem było określenie zależności między poziomem somatomedyny we krwi, a szybkością wzrostu zwierząt. Ponadto starano się określić przydatność tych oznaczeń dla prognozowania tempa wzrostu. Lund-Larsen i wsp. [16] w badaniach przeprowadzonych na bukach w wieku 4—12 miesięcy, wykazali statystyczny wzrost aktywności somatomedyny między 7 a 10 miesiącem życia. Regresja somatomedyny w tym czasie wynosiła 0,11 jedn./ml na miesiąc. Obserwowano ponadto istotną zależność między aktywnością somatomedyny we krwi, a wysokością zwierząt w 12 mie-

siącu życia ($r=0,54$), obwodem klatki piersiowej ($r=0,52$) i spożyciem paszy ($r=0,50$). Nie wykazano natomiast powiązań ze stopniem umięśnienia zwierząt. Wyniki te są pierwszymi próbami wykorzystania oznaczeń poziomu somatomedyny we krwi w hodowli bydła opasowego.

Również obiecujące wydają się być doświadczenia przeprowadzone na trzodzie chlewnej [15], w których wykazano istnienie dodatniej zależności między długością szkieletu zwierzęcia a poziomem somatomedyny w osoczu krwi. W pracy tej porównano również zawartość somatomedyny we krwi dwu linii tuczników, różniących się wysokościami przyrostów ciężaru ciała i grubością słoniny. Wykazano wyższy poziom somatomedyny we krwi świń charakteryzujących się szybkim wzrostem i małą grubością słoniny, niż u świń wolno rosnących o grubej słoninie.

Somatomedyna w określonych okresach życia jest silnie związana z wiekiem królika czy kury. Charrier [2] wykazał wzrost aktywności somatomedyny od 0,5 do 1,0 jedn./ml między 10 a 180 dniem życia królika. U kur natomiast Harvey i wsp. [13] podobną zależność obserwowali do 5 tyg. życia.

Podobnie jak u zwierząt, również u ludzi somatomedyna bierze czynny udział w procesach wzrostu szkieletu kostnego. Hall i Filipsson [12] w badaniach przeprowadzonych na 66 dzieciach w wieku od 7 do 16 lat, prawidłowo rozwijających się, wykazali istnienie korelacji rzędu $r=0,67$ między poziomem somatomedyny A we krwi a przyrostami wzrostu ciała w cm/rok. Zależność ta jest jeszcze wyższa w okresie pourodzeniowym ($r = 0,73$).

Oznaczanie aktywności somatomedyny we krwi znalazło również praktyczne zastosowanie w klinice. Wyłania się bowiem możliwość odróżnienia karłowatości przysadkowej od karłowatości Larona na podstawie oznaczania aktywności somatomedyny po podaniu hormonu wzrostu [6]. W obu bowiem jednostkach chorobowych aktywność somatomedyny jest wyjątkowo niska i na tej tylko podstawie nie można obu typów karłowatości odróżnić od siebie. Po podaniu natomiast hormonu wzrostu obserwuje się zwiększoną aktywność somatomedyny w osoczu karłów przysadkowych. W karłowatości Larona natomiast hormon wzrostu nie wpływa stymulująco na aktywność somatomedyny, co tłumaczy się defektem w zakresie syntezy somatomedyny, której nie można przywrócić podaniem hormonu wzrostu. Brak natomiast somatomedyny we krwi uniemożliwia normalny wzrost.

W przedstawionym opracowaniu z pewnością nie wyczerpano wszystkich problemów dotyczących somatomedyny. Ograniczyły je bowiem tak ramy artykułu, jak również niepełne jeszcze poznanie przez człowieka tego aktywnego czynnika. Dalsze lata z pewnością przyniosą nowe efek-

ty, a poszerzenie naszych wiadomości zależy między innymi od wyizolowania większej ilości somatomedyny, określenia jej budowy, właściwości oraz dokonanie syntezy tego związku. Wydaje się jednak, że czynnik ten, w powiązaniu z przyrostami ciężaru ciała, lub innymi parametrami charakteryzującymi wzrost organizmu, może liczyć na praktyczne zastosowanie go w selekcji zwierząt, głównie tuczu i opasie trzody chlewnej, bydła i owiec.

LITERATURA

1. Ashton I. K., Francis M. J. O.: *J. Endocr.*, 74, 205, 1977.
2. Charrier J.: *Ann. Biol. Anim. Bioch. Biophys.*, 18, 33, 1978.
3. Cohen K. L., Nissley S. P.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 83, 243, 1976.
4. Collins E. J., Lyster S. C., Carpenter O. S., Baker V. F. Lund G. H.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 36, 51, 1961.
5. Daughaday W. H., Salmon W. D., Aleksander F.: *J. Clin. Endocr. Metab.*, 19, 743, 1957.
6. Daughaday W. H.: *Am. J. Med.*, 50, 277, 1971.
7. Daughaday W. H., Hall K., Raben M., Salmon W. D., van den Brande J. L., van Wyk J. J.: *Nature (Londyn)*, 235, 107, 1972.
8. Daughaday W. H., Philips L. S., Herington A. C.: *Adv. Metab. Disord.*, 8, 151, 1975.
9. Francis M. J., Hill D. J.: *Nature (Londyn)*, 255, 167, 1975.
10. Fryklund L., Uthne K., Sieverstsson H.: *Biochem. biophys. Res. Comm.*, 61, 957, 1974.
11. Hall K.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 63, 338, 1970.
12. Hall K., Filipson R.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 78, 239, 1975.
13. Harvey S., Scanes C. G., Falconer J., Bolton N. J., Chadwick A.: *Endocr.*, 73, 10P, 1977.
14. Hurley T. W., D'Ercole A. J., Handwerker S., Underwood L. E., Furlanetto R. W., Fellows R. E.: *Endocrinology* 101, 1635, 1977.
15. Lund-Larsen T. R., Bakke H.: *Acta Agr. Scand.*, 25, 231, 1975.
16. Lund-Larsen T. R., Sundby A., V. Velle W.: *J. Animal. Sci.*, 44, 189, 1977.
17. McConaghey P.: *J. Endocr.*, 52, 1, 1972.
18. Megeysi K., Kahn C. R., Roth J., Nevill D. M., Nissley S. P., Humbel R. E., Froesch E. R.: *J. biol. Chem.*, 250, 8390, 1975.
19. Philips L. S., Young H. S.: *Endocrinology* 99, 304, 1976.
20. Piontek W., Lewandowski J.: *Endokrynologia Polska* 24, 485, 1973.
21. Rinderknecht E., Humbel R. E.: *Proc. nat. Acad. Sci.*, 73, 4379, 1976.
22. Salmon W. D., Daughaday W. H.: *J. Lab. clin. Med.*, 49, 825, 1957.
23. Salmon W. D., Du Vall M. R.: *Endocrinology*, 86, 721, 1970.
24. Salmon W. D., Du Vall M. R.: *Endocrinology*, 87, 1168, 1970.
25. Salmon W. D., Hosse B. R.: *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 136, 805, 1971.
26. Shapiro B., Pimstone B. L.: *Endocr.*, 74, 129, 1977.
27. Shapiro B., Pimstone B. L.: *J. Endocr.*, 77, 233, 1978.
28. Sievertsson H., Fryklund L., Uthne K., Hall K., Westermarck B.: *Adv. Metab. Dis.*, 8, 47, 1975.
29. Spencer G. S. G., Taylor A. M.: *J. Endocr.*, 78, 83, 1978.

30. Takano K., Hall K., Fryklund L., Holmgren A., Sievertsson H., Uthne K.: *Acta Endocr. (Kbh)*, 80, 14, 1975.
31. Uthne L.: *Acta Endocr. ((Kbh)*, 74, Suppl. 175, 1973.
32. Yde H.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 57, 557, 1968.
33. Van den Brande J. L., Du Caju M. V. L.: *Acta Endocrinol. (Kbh)*, 75, 233, 1974.
34. Van den Brande J. L., Van Buul S.: *Israel J. Med. Sci.*, 1, 693, 1975.
35. Van den Brande J. L., Van Buul S.: *Ann. Biol. anim. Bioch. Biophys.*, 18, 11, 1978.
36. Van Wyk J. J., Underwood L. E., Beseman J. B., Hintz R. L., Clemmons D. R., Marshall R. N.: *Adv. Metab. Disord.*, 8, 127, 1975.
37. Zapf J., Waldwogen M., Froesch R.: *Acta Biochem.*, 168, 1975.