

Rapport 88.05

Januari 1988

RUNDER SOMATOTROPINE: ENIGE ASPECTEN  
ROND GEBRUIK EN VEILIGHEID

drs R.J.A. Paulussen\*, drs R. Schilt\*  
en  
ir P.J.M. Berende\*\*, dr S. de Boer\*\*

\* Afdeling Biofarmaceutische Analyse

\*\* Afdeling Toxicologie

Goedgekeurd door: dr F.A. Huf

Rijks-Kwaliteitsinstituut voor land- en tuinbouwprodukten (RIKILT)  
Bornsesteeg 45, 6708 PD Wageningen  
Postbus 230, 6700 AE Wageningen  
Telefoon 08370-19110  
Telex 75180 RIKIL  
Telefax 08370-17717

VERZENDLIJST

INTERN:

directeur  
sectorhoofden  
projectcoördinator  
afdeling BFA (3x)  
afdeling TOX (3x)  
afdeling DGM  
bibliotheek

EXTERN:

leden COKA-werkgroep  
directie DLO  
directie VKA  
directie VD  
directie VZ  
directie RVV  
directie IVVO  
directie IVO  
directie RIVM  
Vakgroep Toxicologie, prof. dr J.H. Koeman  
Vakgroep Dierfysiologie, dr ir G. v.d. Hoek  
ILOB  
CIVO/TNO  
CDI  
COZ  
NIZO  
NRLO, afdeling dierlijke produkten  
HIL, dhr L.J. Schuddeboom  
VHI  
KvW, hoofddirectie  
KvW Utrecht, dhr dr Mol  
Pudoc/Agralin  
dhr ir M. Heuver, Wageningen  
NRLO, dhr ir P.L. Slis  
VU, prof. dr U.A.Th. Brinkman  
TUT, prof. dr A. Bantjes  
HTS/SVL, dhr dr R. Gast  
TUE, prof. dr C.H.M.M. de Bruijn, Vakgroep Medische Chemie

Overname van de inhoud is toegestaan, mits met duidelijke bronvermelding.

Inhoudsopgave

Inleiding . . . . .	1
Groeihormoon . . . . .	2
Historie . . . . .	2
Farmacologische aspecten van somatotropine . . . . .	3
Effect op de melkproduktie . . . . .	6
1. Dosering . . . . .	6
2. Wijze, frequentie en tijdstip van toediening . . . . .	7
3. Tijdsduur van toediening . . . . .	7
4. Hoogte van de melkproduktie . . . . .	8
5. Ras . . . . .	9
6. Klimatologische omstandigheden . . . . .	9
7. Voeding . . . . .	9
8. Overige factoren . . . . .	9
Analysemethoden voor somatotropine . . . . .	9
Gehalten in melk . . . . .	11
Effect op de melksamenstelling . . . . .	11
Somatotropinegehalten in bloed . . . . .	13
Beïnvloeding van gehalten van enkele componenten in bloed . . . . .	14
Het effect van somatotropine op andere species. . . . .	15
Het effect van fragmenten van bST bij mens en dier. . . . .	16
Stabiliteit van eiwitten en absorptie in het maag-darmkanaal . . . . .	17
1. Afbraak van eiwitten in het maag-darmkanaal. . . . .	17
2. Opname van intacte eiwitten. . . . .	17
3. Biologische activiteit. . . . .	19
De immuunrespons op somatotropine . . . . .	20
Conclusies en aanbevelingen. . . . .	23
Literatuur . . . . .	25

### Inleiding

In het afgelopen jaar is er een vrij groot aantal publikaties rond het gebruik van het groeihormoon somatotropine in de melk- en vleesveehouderij verschenen. Naast spectaculaire gegevens over de toename van de melkproduktie van melkkoeien tot 40% en een groeibevorderend effect bij vleeskalveren is veel gespeculeerd over de veiligheid van deze behandeling, voor zowel het dier als de consument, en over de ethische aspecten van de toepassing.

Vooraf de aanwezigheid van residuen in bijvoorbeeld melk en vlees is veelvuldig bediscussieerd. Als veel gebruikte argumenten voor de veiligheid voor menselijke consumptie worden genoemd de afbraak van somatotropines in het maag-darmkanaal (waardoor het niet actief kan zijn), de soort-specificiteit (runder somatotropine zou bij mensen niet werkzaam zijn), de samenstelling (melk van behandelde dieren wijkt niet af van onbehandelde dieren) en tot slot het argument dat men bij consumptie van dierlijke produkten altijd met kleine hoeveelheden natuurlijk voorkomend somatotropine in aanraking komt.

In deze nota worden enkele kritische kanttekeningen gezet bij deze beweringen. Daarnaast wordt ingegaan op de werking en de effecten van somatotropine.

### Groeihormoon

Somatotropine is een eiwithormoon dat bij vissen en zoogdieren een essentiële rol vervult bij de groei en instandhouding van alle weefsels en organen en bij het functioneren van het organisme.

Voor somatropine wordt een aantal namen, afkortingen en voorvoegsels gebruikt. Ter wille van de duidelijkheid worden hier de meest gebruikte benamingen opgesomd.

- somatropine = ST, soms somatropine hormoon = STH
- menselijk of humaan somatropine = hST of HST
- runder of bovine somatropine = bST of BST
- varkens of porcine somatropine = pST of PST
- schapen of ovine somatropine = oST of OST
- groeihormoon = GH
- menselijk of humaan groeihormoon = hGH
- natuurlijk of natief runder somatropine = n-bST
- recombinant runder somatropine = r-bST

### Historie

Reeds aan het begin van deze eeuw ontdekte Ascher in Wenen dat na het verwijderen van de hypofyse (hypofysectomie) bij honden geen groei meer plaatsvond (Tausk, 1979). Een decennium later werd ontdekt dat bij ratten een "reuzengroei" teweeg gebracht kon worden na injectie van een extract van runderhypofyzen. Later slaagde men erin het groeihormoon oftewel het somatropine te isoleren, op te zuiveren en de structuur op te helderen. Bij verdere experimenten bleek dat het rundersomatropine bij apen minder of zelfs niet werkzaam was. Voor therapeutische toepassingen bestond grote interesse voor het humane somatropine, dat aanvankelijk alleen uit hypofyzen van overledenen kon worden gewonnen. Het bleek dat kinderen met een gestoorde, sterk

achtergebleven groei (cretinisme) door behandeling met somatotropine zeer effectief konden worden behandeld. Een probleem was echter de grote schaarste aan groeihormoon. Tegenwoordig bestaat er door de in de laatste jaren sterk opkomende recombinant-technieken een zeer duidelijke toename van het aanbod van somatotropine, zowel humaan als voor een aantal diersoorten.

#### Farmacologische aspecten van somatotropine

Somatotropine (in het vervolg ST genoemd) bestaat bij de mens uit een keten van 191 aminozuren met een molecuulgewicht van ca. 21500 Da. Bij het rund bestaat ST ook uit 191 aminozuren, met een vergelijkbaar molecuulgewicht (Goodman Gilman et al., 1980).

M.b.t. de werking van ST en de daar achter liggende werkings-mechanismen werd en wordt veel onderzoek verricht. Doordat het ST bij zeer veel lichaamsprocessen betrokken is bestaat er een uitermate complexe regulering met andere hormonen, die een rol bij anabole en katabole processen spelen. Bij de stikstof-, koolhydraat- en vethuishouding zijn naast ST, ook insuline, glucocorticoiden (bv. cortisol), catecholamines (bv. adrenaline) en glucagon betrokken.

Grof beschouwd kunnen ST en insuline als de "anabole" en de glucocorticosteroiden en catecholamines als hun katabole antagonisten worden aangemerkt. Tussen ST en insuline bestaat als onderscheid dat ST het lichaamsvet mobiliseert t.b.v. de energievoorziening, terwijl insuline voor dit doel het gebruik van koolhydraten stimuleert en juist de vetopbouw bevordert.

Bij de werking van ST is een aantal stoffen, de zogenaamde somatomedines, betrokken. De hypothese bestaat dat het ST voornamelijk zijn werking uitoefent door stimulatie van de aanmaak van de somatomedines, alhoewel een aantal effecten mogelijk via andere mechanismen tot stand zouden kunnen komen. De somatomedines zijn hitte stabiele eiwitten met een molecuulgewicht van ca. 5000-8000 Da. Een aantal

hiervan is geïsoleerd, gezuiverd en gekarakteriseerd, zoals het non-suspressible insulin-like activity substance (NSILA-S), oftewel insulin-like growth factor type I (IGF-I), oftewel somatomedine C, IGF-II en het multiplication stimulatory active agent (MSA). Delen van de somatomedine moleculen komen overeen met het insuline molecuul, hetgeen een aantal overeenkomende effecten verklaart. Uit somatotropine kan een 5000 Da fragment gevormd worden dat een somatomedine-achtige activiteit bevat. Andere factoren die betrokken zijn bij de groei van een aantal weefsels, zoals de nerve growth factor (NGF), de epidermal growth factor (EGF), de fibroblast growth factor (FGF) en het erythropoietine bevatten ook een somatomedine-achtige werking.

ST wordt geproduceerd in de hypofysevoorkwab en aan de bloedbaan afgegeven na een stimulans door een groeihormoon afgifte factor (GHRF, growth hormone releasing factor) die in de hypothalamus geproduceerd wordt (Fig. 1; naar Scanes, 1984). De hypothalamus produceert tevens een ST afgifte remmend peptide, het SRIF (somatotropin release inhibiting factor of somatostatine). T.o.v. andere hypofysaire hormonen (waar afgifte alleen geregeld wordt door een negatieve feed-back) is hier sprake van zowel een positieve als een negatieve stimulatie door de hypothalamus. Hiernaast hebben ook andere factoren en hormonen via verschillende wegen, soms afhankelijk van de omstandigheden, invloed op de afgifte van ST. Het uit de hypothalamus afkomstige thyreotropine releasing hormone (TRH) dat de hypofyse stimuleert tot de afgifte van het schildklier stimulerend hormoon (TSH) heeft in een aantal gevallen een ST afgifte tot gevolg. Ook de catecholamines en het bijnier stimulerend hormoon (ACTH, adreno-corticotroop hormoon) kunnen, mogelijk als gevolg van stress (hitte, schrik), de ST secretie stimuleren. Een nog niet geheel duidelijke rol spelen de geslachtshormonen (Knoppert en Peters, 1987). Androgenen (bv. testosteron) veroorzaken een stijging van de ST concentratie in bloedserum. Ohlsson et al. (1987) vonden een GHRF

geïnduceerde GH secretie onder invloed van endogeen testosteron in vitro. Ook het voedingspatroon heeft een invloed op de ST concentratie in bloedserum. Door vasten ontstaat een verhoogde concentratie, terwijl de ST concentratie door voedselopname tijdelijk afneemt.

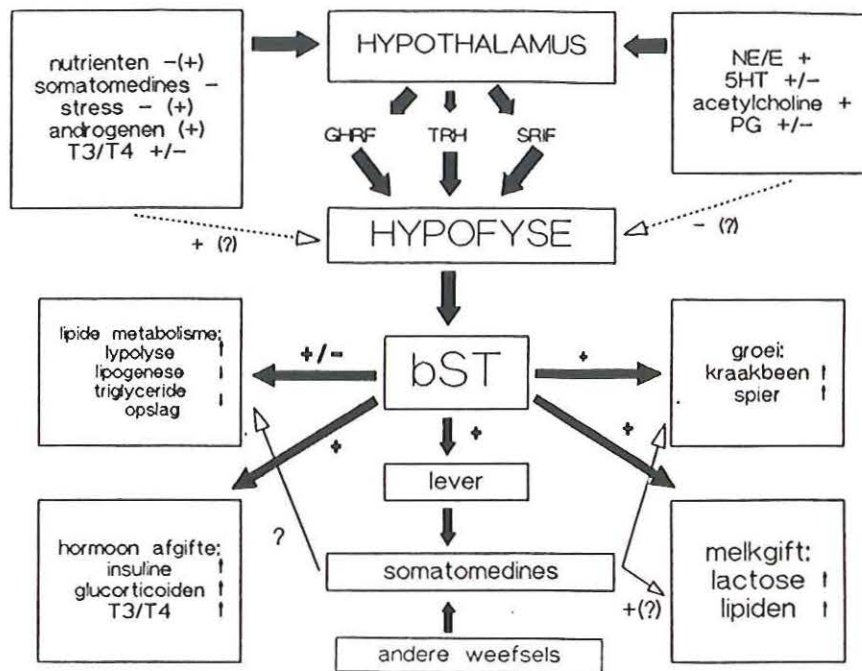


Fig. 1. De rol van bST.

Zoals ook voor andere eiwithormonen is beschreven wordt bST niet met een constante snelheid afgegeven door de hypofyse maar duidelijk pulsgewijs. Onderzoek bij stieren en schapen heeft uitgewezen dat de ST concentratie een episodisch verloop vertoont: steeds een verschillend maximum na een periode van 4-6 uur (Davis et al., 1970; Moseley et al., 1982). Het ST patroon bij runderen lijkt geen duidelijke relatie te hebben met voedingstijden en de tijd van de dag, ook zijn



er grote individuele verschillen in de patronen (Gluckman et al., 1987). Deze patronen zijn echter per individu over een langere tijd zeer constant. De patronen zijn verschillend voor de diverse species (Moseley et al., 1982), daarnaast bestaan er verschillen tussen mannelijke en vrouwelijke dieren. Door deze grote variaties in de ST concentratie is het niet mogelijk normaalwaarden vast te stellen. Door de complexe beïnvloeding van de ST afgifte, en mogelijk ook de beïnvloeding van het metabolisme van ST, is de ST concentratie in bloedserum en waarschijnlijk ook in andere matrices niet constant.

#### Effect op de melkproduktie

Het effect van ST op de melkproduktie is al ruim 50 jaar bekend. Aanvankelijk werden voor dit doel ruwe hypofyse-extracten gebruikt, later gezuiverde preparaten. De laatste jaren zijn er via recombinant-DNA technieken grotere hoeveelheden bST beschikbaar. Verschillende onderzoekers hebben aangetoond dat in ieder geval een groot aantal effecten van de synthetische, recombinant bST vormen gelijk is aan die van het natuurlijke bST, afkomstig uit hypofyses van geslachte dieren (Bauman et al., 1985a,b). De effecten kunnen zeer aanzienlijk zijn, in de literatuur worden verhogingen van de melkproduktie van 10 tot 45% vermeld (Oldenbroek et al., 1987). De grootte van de effecten zijn afhankelijk van de volgende factoren:

##### 1. Dosering

Bauman et al. (1985a) en Eppard et al. (1985b) vonden een duidelijke vergroting van het effect in relatie tot de hoeveelheid toegediend bST van 0 tot 40.5 mg/dag respectievelijk van 0 tot 100 IU/dag. Bij de hoogste doseringen was er echter wel sprake van een afnemende meeropbrengst.

## 2. Wijze, frequentie en tijdstip van toediening

Frank et al. (1983) dienden dagelijks een bepaalde hoeveelheid bST op drie verschillende manieren toe, namelijk via een infuus, via een eenmalige subcutane injectie en via een "pulsed" injectie zes keer per dag. De melkproduktie werd bij alle drie de toedieningswijzen in gelijke mate verhoogd. Vooral bij langwerkende preparaten wordt werking beïnvloed door de mate waarin het bST vrijkomt uit de injectie of implantatieplaats. De afgiftesnelheid wordt sterk bepaald door de samenstelling van het preparaat en de doorbloeding van het desbetreffende weefsel (vergelijk de mate van doorbloeding van het kossuum met die van de ribwand (subcutane applicatie) en de halsspier met die van de bilspier (intramusculaire toediening)). Experimenteel onderzoek, zoals dit momenteel wordt uitgevoerd (Rijkema et al., 1987 en Oldenbroek et al., 1987), moet uitwijzen welke toedieningsvorm voor somatotropine de beste resultaten oplevert.

Uit proeven van McCutcheon en Bauman (1986a) bleek duidelijk dat het effect verkregen met een dagelijks geïnjecteerd preparaat afnam als het vervolgens om de dag werd toegediend. Machlin (1973) daarentegen zag in experimenten een gelijke respons van de melkproduktie bij zowel toediening om de drie dagen als bij een dagelijkse toediening, mits de dosering bij de driedaagse toediening werd verhoogd van 20 IU tot 60 IU bST.

Toediening aan het begin van de lactatieperiode laat duidelijk minder grote procentuele effecten zien dan toediening na de piek in de melkproduktie acht tot negen weken post-partum (Peel et al., 1983 en Richard et al., 1985). Absoluut gezien zijn de verschillen in effect minder groot; zo vonden Peel et al. (1983) in het begin van de lactatie een produktieverhoging van 4.3 kg melk, verder op in de lactatie was dit 3.9 kg.

## 3. Tijdsduur van toediening

Bij experimenten zijn na bST toediening verhogingen van de melk-

produktie van 10 tot 45% gemeten. Deze verhoging heeft zowel betrekking op kortlopende (enkele weken) als op meer dan 27 weken durende proeven (het grootste deel van de lactatieperiode). Voor de praktijk is het vooral van belang welke produktieverhoging gedurende een hele lactatieperiode wordt bereikt. In het volgende overzicht worden de resultaten van proeven van 22 weken en langer weergegeven.

*Tabel 1. Het effect van bST op melkproduktie*

Auteur	Lengte (weken)	Dosering (mg/tijds-eenheid)	Aanvang (weken post partum)	Melkprod. (kg)	Toe-name (%)
Peel et al.(85)	20	50/dag	3	19,8	18
Bauman et al.(85a)	27	40,5/dag	12	27,9	41 <sup>a</sup>
Farries et al.(87)	24	320-760/2wk	6-14	26-18	tot30 <sup>b</sup>
Rijpkema et al.(87)	32	500/14dagen	9	22,9	17
Oldenbroek et al.(87)	28	620/2wk	12	20,9	16 <sup>c</sup>

<sup>a</sup> bij hoogste dosering

<sup>b</sup> bereikt 1 tot 2 weken na elke applicatie; in vierde week steeds gelijk aan controlegroep

<sup>c</sup> in vierde week na toediening was er steeds geen effect meer aanwezig

#### 4. Hoogte van de melkproduktie

Zowel bij hoog als bij laag producerende dieren zijn grote (absolute) effecten gemeten; bij laag producerende koeien zijn de procentuele verbeteringen van de melkproduktie in het algemeen groter (Davis en Bass, 1987). Bij proeven in ons land met zeer produktieve melkkoeien kwam dit effect niet zo duidelijk naar voren. Bij Rijpkema et al. (1987) waren de absolute effecten bij melkkoeien en vaarzen vergelijkbaar en er kon ook geen verschil in reactie van zeer hoog en iets minder hoog producerende dieren worden vastgesteld (Rijpkema, persoonlijke mededeling). Oldenbroek et al. (1987) vonden een tendens tot een groter absoluut effect bij dieren die in de maanden voorafgaand aan de bST behandeling minder melk gaven. Deze gegevens zijn echter gebaseerd op een beperkt aantal dieren per proefgroep, name-

lijk vier binnen elk ras en per behandeling.

#### 5. Ras

Rijkema (1986) kwam op grond van een literatuurstudie tot de conclusie dat bST zowel bij melk als bij vleesrassen effectief is. Ook Oldenbroek et al. (1987) konden in hun onderzoek met zwartbonten (FHxFH), MRY en Jersey geen significante ras/behandelings interacties vaststellen.

#### 6. Klimatologische omstandigheden

Er is nog weinig onderzoek gedaan naar de invloed van het weer of het klimaat in de stal op de grootte van het effect. Wel vonden Mohammed en Johnson (1985) dat bST zelfs onder hitte-stress (29 graden) nog effectief was.

#### 7. Voeding

De eerste weken na het begin van de bST toediening neemt de melkproductie toe zonder dat de voeropname groter wordt (dalende, soms zelfs negatieve energiebalans). Later neemt de voeropname toe, waardoor een energie-evenwicht ontstaat. De dieren moeten dus adequaat gevoerd worden wil het maximale effect bereikt worden. Met name het energie- en eiwitgehalte van het voer zijn van belang.

#### 8. Overige factoren

Naast de genoemde aspecten kunnen nog andere factoren worden genoemd die van invloed kunnen zijn op het uiteindelijke effect van bST toediening, zoals de leeftijd en de gezondheidstoestand van de dieren en de huisvestingssystemen.

#### Analysemethoden voor somatotropine

Voor de meting van ST gehalten in serum en melk zijn door verschil-

lende onderzoekers immunochemische bepalingmethoden ontwikkeld (Hart et al. (1975); Lorensen (1983); Krivi en Rowold (1986); Torkelson et al. (1987); Alfaya et al. (1987)). De methoden die op melkmonsters kunnen worden toegepast zijn in het algemeen te ongevoelig. Veelal heeft een hoog percentage van de gemeten melkmonsters van onbehandelde dieren een gehalte dat rond of onder de detectiegrens ligt. Dit betekent dat tijdens dierexperimenteel onderzoek niet of in onvoldoende betrouwbare mate kan worden vastgesteld of het bST gehalte als gevolg van (r-)bST toediening wordt beïnvloed.

Een tweede aspect betreft de specificiteit van de beschreven methoden. De toegepaste immunochemische technieken maken géén onderscheid tussen natuurlijk en recombinant bST. Niet bekend is of eventuele bST en recombinant-bST fragmenten of metaboliëten, die nog een deel van de karakteristieke structuur van het bST bezitten, in deze bepalingen voor bST worden aangezien, of juist helemaal niet gemeten worden (terwijl ze nog wel biologische activiteit bevatten). Ook is niet onderzocht wat de invloed van een mogelijke kruisreactiviteit met andere (sterk) op bST gelijkende peptiden (bv. prolactine) op de bepaling is.

Om een goed inzicht te krijgen in de effecten van bST toediening moet in de analysetechnieken een hogere gevoeligheid gehaald dan tot nu toe in de beschikbare immunoassays, zodat normaalwaarden en bST gehalte in melk van behandelde dieren nauwkeuriger vastgesteld kunnen worden. Een mogelijkheid om een betrouwbaarder beeld te krijgen van de uitscheiding van bST in melk is een concentratieverhoging van het hormoon voorafgaand aan de bepalingmethoden. De methode die op het RIKILT in samenwerking met de Vrije Universiteit in Amsterdam ontwikkeld werd voor de bepaling van steroidhormonen (Farjam et al., 1988) lijkt hiervoor ook toepasbaar.

### Gehalten in melk

Over bST gehalten in melk zijn betrekkelijk weinig gegevens beschikbaar. Torkelson et al. (1987) hebben met een radioimmunoassay (detectiegrens 0.3 ng/ml (ppb)) mengmelk van 120 veehouders onderzocht. Het bST gehalte was steeds minder dan 1 ng/ml en veelal lager dan de detectiegrens. Hiernaast is melk van 20 met bST behandelde en 20 controledieren gedurende 5 weken wekelijks geanalyseerd, daarna eenmaal per 4 weken. Op geen enkel tijdstip was verschil aanwezig tussen de controle en de behandelde groep. De gehalten bST in de melk waren in 9 van de 14 weken lager dan de detectiegrens; de overige perioden werden concentraties gemeten tussen 0.3 en 0.5 ng/ml. Bij de controlegroep lag het bST gehalte in de melk gedurende 11 van de 14 weken onder de detectiegrens en werden incidenteel concentraties tussen 0.3 en 0.6 ng/ml gemeten. Hart et al. (1985) rapporteerden gehalten tot 2 ng/ml in zowel controle als bST behandelde dieren. Wel vonden zij een duidelijke toename van het aantal melkmonsters dat detecteerbare hoeveelheden bST bevatte (meer dan 0.3 ng/ml) na toediening van r-bST. Mohammed en Johnson (1985) vonden in melk van controledieren een bST concentratie van 6,8 ng/ml. Hitte-stress, al dan niet gecombineerd met bST toediening, induceerde een toename met  $\pm 50\%$  van het somatotropinegehalte van de melk.

### Effect op de melksamenstelling

Bij de bestudering van de effecten van bST op de melksamenstelling moet een duidelijk onderscheid worden gemaakt tussen effecten tijdens de eerste dagen en weken na toediening en effecten op langere termijn.

In de eerste weken van de behandeling verkeren de dieren in een negatieve energiebalans, waardoor de samenstelling van de melk kan veranderen (Geppard et al., 1986). Later herstelt de energiebalans

zich of wordt zelfs positief en is de samenstelling van de melk niet veranderd (Bauman en McCutcheon, 1986b).

Tijdens de negatieve energiebalans gaat het dier opgeslagen vetreserves benutten. Dit heeft tot gevolg dat de vetzuursamenstelling en ook het vetgehalte van de melk verandert (McCutcheon en Bauman, 1986b). Richard et al. (1985) dienden tien dagen lang bST toe aan koeien die 20 tot 60 dagen tevoren gekalfd hadden. Bij de eerste groep nam het vetgehalte significant toe van 3.9 naar 4.7% en bij de 60 dagen post partum koeien van 3.6 naar 3.9% (niet significant). Het eiwitgehalte veranderde niet significant. Ook Peel et al. (1981b) zagen het vetgehalte significant toenemen in een periode van 11 dagen, het eiwitgehalte daalde hier wel significant; het lactosegehalte steeg met 5% (niet significant). Frank et al. (1983) toonden eveneens een significante daling van het eiwitgehalte aan in een periode van 10 dagen, het vet- en lactosegehalte verschilden niet van dat van de controlegroep. De applicatie tijdens deze proef vond laat in de lactatieperiode plaats (245 dagen post-partum). Mogelijk is dit een verklaring voor het onveranderde vetgehalte. In de proef van Pocius en Herbein (1986) verschilde de melksamenstelling bij behandelde dieren (119 en 123 dagen post-partum) niet significant van de controlegroep. Wel was er een tendens naar een iets hoger vet- en een iets lager eiwitgehalte, vergelijkbaar met de resultaten van McCutcheon en Bauman (1986b) die bST 253 dagen post-partum injecteerden. Bij Eppard et al. (1985b) daarentegen was het vetgehalte wel significant verhoogd en het eiwitgehalte significant verlaagd ofschoon er sprake was van toediening laat in de lactatieperiode (192 dagen post-partum). Wel moet hierbij worden opgemerkt dat deze veranderingen alleen bij de hoogste doseringsgroep (100 IU/dag) plaatsvonden.

In dezelfde proef, die ook elders is beschreven (Eppard et al., 1985a) was in de hoogste doseringsgroep het alfa-lactalbuminegehalte verhoogd, terwijl ook het percentage C16:1 en C18:1 vetzuren toegenoo-

men was. Van de onderzochte mineralen was alleen het magnesiumgehalte significant hoger in de 50 en 100 IU/dag groepen. Bitman et al. (1984) wezen ook op de veranderingen in de vetzuursamenstelling en een toename van het vetgehalte van 3.5 naar 4.4%. Het fosfolipide en cholesterolgehalte daalde significant. Farries en Profittlich (1987) wezen op het grotere aandeel C18:0-C18:3 vetzuren in het vet bij behandelde dieren na de eerste behandeling.

In de langlopende proeven van Bauman et al. (1985a), Peel et al. (1985) en Rijpkema et al. (1987) werden gemiddeld over de gehele proefperiode geen verschillen in vet-, eiwit- en lactosegehalte in de melk waargenomen. Bij Oldenbroek et al. (1987) was het vetgehalte elke tweede en derde week na behandeling verhoogd, in de vierde week was geen verhoging meetbaar. Deze resultaten lijken op de effecten die optreden bij de eerder beschreven kort durende experimenten.

Over de invloed van bST toediening op de uitscheiding van andere hormonen in melk, zoals prolactine, en somatomedines is weinig bekend. Mohammed en Johnson (1985) vonden een toename van de prolactine concentratie in melk van 7 tot 11 ng/ml in de controle-groep naar circa 17 ng/ml bij met bST behandelde dieren.

#### Somatotropinegehalten in bloed

Na toediening van bST stijgt het gehalte in bloed sterk (Peel et al., 1981a,b, Frank et al., 1983, Eppard et al., 1985, Pocius en Herbein, 1986 en McCutcheon en Bauman, 1986a). Door de sterke schommelingen van het natuurlijke gehalte van bST gedurende de dag en het ontbreken van een repeterend 24 uren ritme zijn geen normaalwaarden vast te stellen. Mogelijk zijn wel "normaalpatronen" van het serum ST gehalte te karakteriseren. Echter, voor controle doeleinden zijn dergelijke patronen niet bruikbaar. Controle op de toediening van bST bij melkvee door het opsporen van afwijkingen ten opzichte van het normale patroon zou een continue (elke 15 minuten) bemonste-



ring van het dier gedurende een aantal etmalen vereisen.

Ook de fysiologische status van het dier speelt een belangrijke rol. Tijdens de laatste weken van de dracht neemt het bST gehalte toe en bereikt een piekwaarde rond de partus. Gedurende de lactatie is het concentratieverloop synchroon met de lactogenese (Burvenich, 1983), afnemend tijdens de lactatie. Tijdens de droogstand worden de laagste waarden gemeten.

Melkrassen (Holstein) hebben hogere serum bST gehalten dan vleesrassen (Hereford) en ook binnen rassen bestaan er verschillen tussen laag- en hoogproducerende koeien. Zo vonden Gorewit en Agyemang (1983) vooral in het begin van de lactatie verschillen in serum bST-concentratie tussen koeien met een produktie van meer dan 6800 liter melk en dieren die minder dan deze hoeveelheid per lactatieperiode produceerden. Bij proeven met verschillende doseringen en toedieningsvormen werden waarden tussen 7.5 en 30 ng/ml gevonden t.o.v. 5 tot 6 ng/ml in de controlegroepen (Peel et al., 1981a,b, Frank et al., 1983, Eppard et al., 1985, Pocius en Herbein, 1986 en McCutcheon en Bauman, 1986a).

Bij de proeven van Pocius en Herbein, en van McCutcheon en Bauman werden ongeveer twee uur na injectie piekconcentraties van 25 tot 35 ng/ml gemeten. Op de dag na toediening traden grote variaties in de bST gehalten op.

#### Beïnvloeding van gehalten van enkele componenten in bloed

In bloed is vooral onderzoek verricht naar de invloed van ST op de concentratie van vetzuren, beta-hydroxyboterzuur, ketonlichamen en glucose. Peel et al. (1981), Eppard et al. (1985), Pocius en Herbein (1986) en Farries en Profitlich (1987) rapporteerden geen veranderingen van het bloedglucosegehalte door bST toediening. Laatst genoemden vonden een tendens tot iets hogere waarden bij behandelde dieren. De vetzuursamenstelling was volgens Bitman et al. (1984),

Peel et al. (1985) en Bauman et al. (1985a,b) eveneens niet veranderd. Wel werd tijdens de eerste weken van de behandeling een stijging van het percentage vrije vetzuren geconstateerd door Peel et al. (1981), Pocius en Herbein (1986) en McCutcheon en Bauman (1986a). Peel et al. (1981) hebben ook gekeken naar de concentraties van beta-hydroxyboterzuur en ketonlichamen in het bloed. Deze waarden bleken niet veranderd te zijn, ofschoon bij een onvolledige vetafbraak een verhoging verwacht zou kunnen worden. Farrier en Profittlich (1987) vonden, vooral na de eerste injectie, wel hogere gehalten aan ketonlichamen in het bloed, vooral bij de groepen met een hoge dosering. Bij lagere doseringen traden t.o.v. de controlegroep geen duidelijke verschillen op. In de proef van Oldenbroek et al. (1987) tenderden de gehalten aan beta-hydroxyboterzuur tot iets hogere waarden bij de behandelde dieren.

Peel et al. (1981a,b), Eppard et al. (1985), Pocius en Herbein (1986) en Oldenbroek et al. (1987) hebben naast bST één of meerdere hormonen bepaald: insuline, prolactine, cortisol, thyroxine en triiodothyronine (T3). Afgezien van Peel et al. (1981a,b), die een iets hoger prolactinegehalte bij de behandelde dieren vonden, werden er geen significante verschillen tussen de proefgroepen waargenomen.

#### Het effect van somatotropine op andere species.

Ten onrechte wordt vaak gesuggereerd dat somatotropines 100% species-specifiek zijn. Uit vele onderzoeken is gebleken dat bijvoorbeeld hST effect heeft op konijnen en ratten. Dit geldt ook voor bST. Veel van deze experimenten zijn uitgevoerd om aan te tonen dat de metabole effecten van de via recombinant DNA geproduceerde somatotropines vergelijkbaar zijn met die van hypofysair groeihormoon.

Het effect van fragmenten van bST bij mens en dier.

De groep van Sonenberg heeft veel onderzoek gedaan naar de effecten van fragmenten van bST bij de rat (Sonenberg et al., 1965). Na een milde digestie van bST met trypsine (een selectief peptidase) werd een fragment geïsoleerd dat vervolgens weer gedissocieerd werd in twee componenten: AI en AII. De kleinste component, AIII, heeft een molecuulgewicht van 5000 Da en bestaat uit het midden van het bST molecuul, de aminozuren 96-133 (Sonenberg et al., 1968). Dit fragment heeft een duidelijk metabool effect bij de rat. Onderzoeken met het AIII fragment hebben laten zien dat het somatomedine-achtige effecten heeft in concentraties die in het fysiologische gebied liggen (Liberti en Miller, 1978). In een klinische tests werden verschillende trypsine digesten van bST toegediend aan mensen, waarbij in een aantal gevallen een significante toename van de stikstof retentie optrad (Nadler et al., 1967). In een studie met toediening van het AIII fragment bij patienten werd een significante groeitoename geregistreerd. Metabole effecten traden zowel op bij hypopituitaire als in niet-hypopituitaire patienten en bij diabetische en niet-diabetische personen (Levine et al., 1973).

Metabole effecten van bST fragmenten verkregen uit chymotrypsine digestie werden al in 1958 gemeld (Forsham et al.), maar konden later niet bevestigd worden (Bergental et al., 1960). Met op een andere manier bereide chymotryptische digesten van bST werden wel hST-achtige metabole effecten bij de mens aangetoond (Elsair et al., 1964).

Infusie van een 15-aminozuren lang fragment (aminozuren 32-46) van hST bij honden veroorzaakte een duidelijke toename in insuline- en glucagonspiegel (Stevenson et al., 1987).

### Stabiliteit van eiwitten en absorptie in het maag-darmkanaal

#### 1. Afbraak van eiwitten in het maag-darmkanaal.

Eiwitten die via het dieet in het maag-darmstelsel terechtkomen worden door de zure pH in de maag gedenatureerd, waardoor ze beter toegankelijk zijn voor de eiwitsplitsende enzymen (peptidases) in het darmstelsel. Peptidases breken eiwitten af tot kleine peptiden (2 tot 4 aminozuren) en vrije aminozuren, die vervolgens met behulp van carrier-systemen opgenomen worden. Er bestaan afzonderlijke transportsystemen voor vrije aminozuren en voor peptiden (Adibi, 1980). De peptide-carrier in de darmwand transporteert di- en tripeptiden. Grotere peptiden worden eerst door specifieke peptide-hydrolases verder afgebroken. Aanvankelijk werd gedacht dat alleen vrije aminozuren, ontstaan uit eiwit afbraak, opgenomen worden. Later is echter gebleken dat de opnamesnelheid van di- en tripeptiden hoger is dan van vrije aminozuren (Adibi, 1976; Gardner et al., 1983).

#### 2. Opname van intacte eiwitten.

Orale opname van antigenen wekt een locale immuunrespons op, waardoor IgA antistoffen in het darmlumen uitgescheiden worden. Complexering van deze IgA met antigenen geeft een substantiele vermindering van de opname van antigenen in de circulatie (Ogra en Karzon, 1970). De darmwand neemt echter wel intacte macromoleculen (en zelfs partikels) op. Al langer is bekend dat direct na de geboorte de darmwand een hogere permeabiliteit heeft. Op deze manier kunnen onder andere complete immuunglobulinen (molecuulgewicht 160.000 - 500.000;  $\pm$  1500 - 5000 aminozuren) uit moedermelk opgenomen worden die de pasgeborene bescherming kunnen bieden tegen o.a. antigene stoffen in het voedsel. Babies die met moedermelk gevoed worden zijn in het algemeen minder gevoelig voor pathologische penetratie van schadelijke stoffen uit het darmstelsel (Walker, 1985). De ontwikkeling van allergische symptomen lijkt geïnitieerd te worden door de opname van intacte

macromoleculen uit voedsel. Absorptie van minuscule hoeveelheden van hetzelfde antigeen in later stadium vormt de aanzet voor de allergische reactie. Recentelijk is een overzicht verschenen van studies aan opname van intacte macromoleculen via het darmstelsel en de gevolgen daarvan voor voedsel intolerantie en allergiën (Cunningham-Rundles, 1987).

Opname van macromoleculen bij pasgeborenen is ten dele selectief, maar een groot deel van de absorptie van intacte macromoleculen is aselectief. Onderzoeken hebben uitgewezen dat de verhoogde darmpermeabiliteit bij de mens na ongeveer 3 maanden verdwenen is. Bij kinderen die met moedermelk gevoed worden verloopt dit proces in het algemeen sneller dan bij voeding met artificiële produkten. Na het "sluiten" van de darmwand is er nog steeds opname van intacte macromoleculen door de darm. Aangetoond is dat in volwassen individuen een kleine, maar significante, opname van macromoleculen plaatsvindt. Zo vonden Warshaw et al. (1974) dat ongeveer 2% van oraal toegediend albumine in intacte vorm in bloed en lymfe verschijnt. Deze hoeveelheid is zo klein dat de bijdrage aan de voedselopname verwaarloosbaar is. Wat de rol van dit proces echter is in pathologische ontwikkelingen is nog niet volledig duidelijk. Al in 1935 hebben Wilson en Walzer aangetoond dat ovalbumine (een eiwit uit eieren) in onverteerde vorm uit het voedsel opgenomen kan worden. In bloedserum van de proefpersonen vonden zij complexen van immuunglobulinen en voedingseiwitten (immuunprecipitinen), waarmee zij lieten zien dat intacte eiwitten uit het voedsel de darmwand kunnen passeren en vervolgens in de circulatie in het lichaam terecht kunnen komen. Bij opname van een normale hoeveelheid melk vonden Korenblat et al. (1968) bij 15-30% van de normale volwassen proefpersonen immuunprecipitinen van melkeiwitten.

Vermoed wordt dat de opname van intacte macromoleculen een belangrijke rol speelt in het ontwikkelen van allergische reacties. De mate van permeatie van macromoleculen is niet enkel afhankelijk van het

ontwikkelingsstadium van de darm en van de voedselbelasting, maar wordt bepaald door complexe interacties tussen het individu, het antigeen, de voedingsstatus en de fysiologische conditie. Pathologische condities kunnen een sterke verhoging van de darmpermeabiliteit veroorzaken (Bienenstock, 1984). Onder andere bij IgA deficiëntie is een sterk verhoogde opname van intacte macromoleculen waargenomen (Cunningham-Rundles et al., 1978). Ook bij overgevoeligheidsreacties op voedingsstoffen kan de permeabiliteit drastisch verhoogd worden. Deze reacties kunnen optreden bij hele normale voedingsprodukten, onder andere ook met melk.

### 3. Biologische activiteit.

Afbraak van eiwitten betekent niet per definitie dat de biologische activiteit van het eiwit verloren gaat. De kleinere fragmenten die ontstaan kunnen soms een verminderde of veranderde werking hebben, maar geven veelal zelfs een vergelijkbare werking. In dit opzicht zijn de bevindingen rond de vorming van peptiden uit caseïne afkomstig uit moedermelk zeer interessant (Van Dongen, 1987). In maag en darmen wordt caseïne gesplitst tot twee peptiden met een opiaatwerking, het beta-casomorfine en het delta-casomorfine. Het betreft twee peptiden van 5 en 7 aminozuren die een potentie van 4% respectievelijk 0,4% van die van morfine hebben. Het delta-casomorfine blijkt bestand te zijn tegen de in de darm aanwezige peptidases, het blijft derhalve intact en kan zijn effect in de darm uitoefenen. Omdat melk veel caseïne bevat kan er voldoende van de casomorfines gemaakt worden om enig effect te kunnen uitoefenen. Of deze casomorfines ook vanuit de darm worden geabsorbeerd is nog niet bekend. Wel heeft onderzoek aangetoond dat beta-casomorfine de absorptie van zouten in de darm bevordert (Hautefeuille et al., 1986). Speculatief is of deze casomorfines bij babies een gunstige invloed op het maagdarmkanaal uitoefenen of dat babies door de aanwezigheid van deze stoffen zo gretig drinken en hierdoor rustig worden.

De immuunrespons op somatotropine

Het immuunsysteem heeft de mogelijkheid om een afweerreactie op te bouwen tegen elke stof die het lichaam binnendringt. Hiervoor is een enorm aantal B cellen beschikbaar die; via een aantal verschillende routes, geactiveerd kunnen worden. Lichaamseigen stoffen worden door dit systeem niet als bedreigend herkend. De B-cel produceert een antistof die de lichaamsvreemde stof (het antigeen) herkent, zodat deze opgeruimd kan worden. De manier van activeren van een bepaalde B cel is afhankelijk van het soort antigeen. Immunologisch valt somatotropine als eiwit in de groep T-cel afhankelijke antigenen. Deze antigenen worden opgenomen door macrofagen, waar ze enzymatisch in fragmenten gesplitst worden. Deze fragmenten worden geëxposeerd op het oppervlak van de macrofaag, waar vervolgens associatie met een HLA-D molecuul plaatsvindt. Dit complex tussen het fragment van het antigeen en het HLA-D wordt op zijn beurt herkend door een T-helper cel. Via een aantal signaalstoffen die door de macrofaag en de T-helper cel geproduceerd worden zal uiteindelijk een B-cel tot proliferatie aangezet worden. Een lichaamsvreemd eiwit zal door de macrofaag in een aantal fragmenten gesplitst worden. Door de splitsing in fragmenten worden een aantal B cellen geactiveerd. Elke B-cel cloon produceert een type antilichaam, telkens tegen een ander deel (epitop) van het antigeen.

Uit studies met recombinant hST is gebleken dat dit een immuunrespons op kan wekken in de mens. Het enige verschil tussen r-hST en n-hST is de aanwezigheid van één extra aminozuur, namelijk een methionine residu aan het N-terminale einde van het eiwit. De geproduceerde antistoffen blijken echter slechts voor een klein deel gericht te zijn tegen het N-terminale deel van het molecuul. Mogelijk is dat een gevolg van een (klein) verschil in tertiaire (ruimtelijke) structuur tussen n-hST en r-hST. Het lijkt in ieder geval dat het N-terminale deel van het eiwit een zwak immunogeen is. De N-terminale

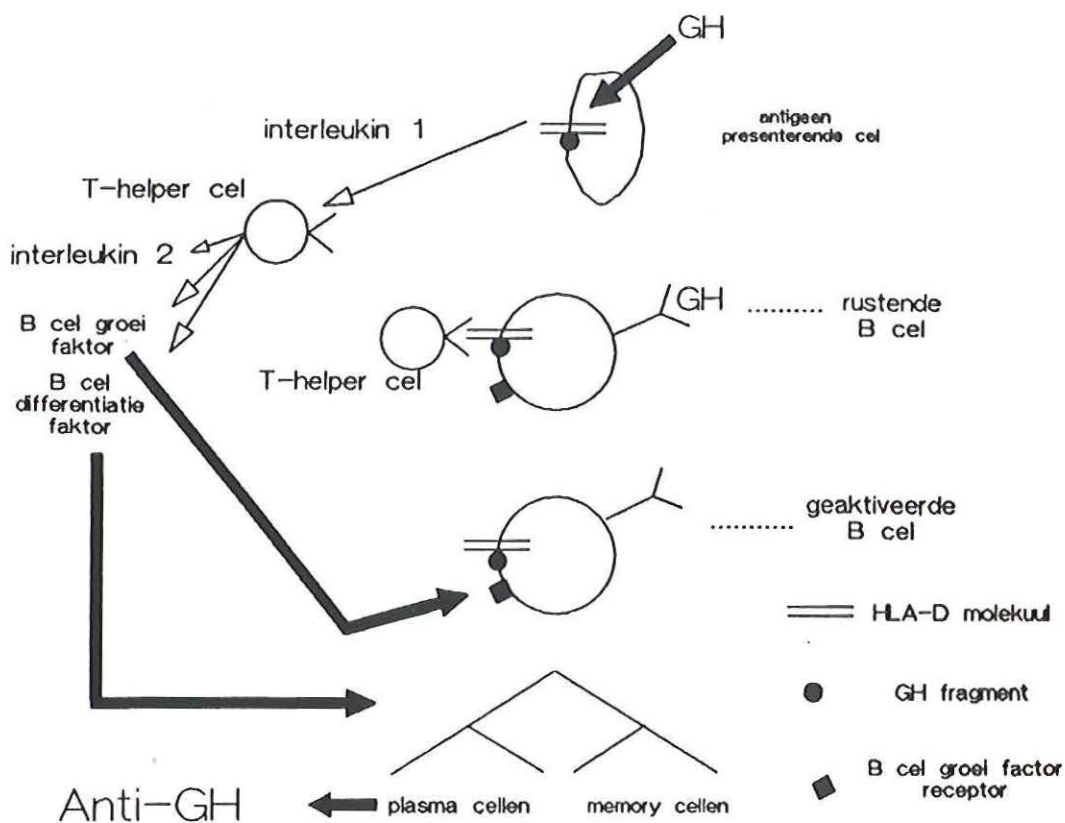


Fig. 2. De immuunrespons op groeihormonen.

methionine speelt waarschijnlijk wel een belangrijke rol in de herkenning van het r-hST als lichaamsvreemd door de T-helper cellen. Als de herkenning eenmaal heeft plaatsgevonden kunnen de geactiveerde T-helper cellen elke antigeen specifieke B-cel stimuleren. Dit betekent dat antistoffen geproduceerd kunnen worden die niet kwalitatief verschillen van antistoffen die tegen natuurlijk hST opgewekt



zouden kunnen worden. De klinische betekenis van deze immuunrespons (die bij ca. 35% van de met recombinant hST behandelde patienten gevonden wordt) is - gelukkig - zeer beperkt, omdat de groeistimulatie (het beoogde klinische effect) er niet of nauwelijks door geremd wordt in de meeste patienten. Incidenteel kunnen echter problemen verwacht worden, vergelijkbaar met de antilichaaamvorming die bij een aantal insuline gebruikende diabetes patienten voorkomt en daar resulteert in een sterk gereduceerde insulinewerking.

Conclusies en aanbevelingen.

Geconcludeerd kan worden dat bST zeer effectief is in de verhoging van de melkproduktie. Met name voor de zeer lang werkende toedieningsvormen is de juiste formulering echter nog niet gevonden, gezien de geringe of zelfs het ontbreken van een verbetering van de melkproduktie in de periode twee tot drie weken en vooral drie tot vier weken na behandeling.

Uit onderzoek blijkt dat kort na het begin van de bST behandeling in het bloed veranderingen op kunnen treden in het vetzuurpatroon, het gehalte aan beta-hydroxyboterzuur en ketonlichamen. Later zijn deze veranderingen niet meer aantoonbaar. Het gehalte aan bST is bij behandelde dieren duidelijk verhoogd.

Op grond van literatuurgegevens bestaat geen eenduidig beeld over het absoluut niet werkzaam zijn van bST en r-bST bij de mens als gevolg van afbraakprocessen in het maag-darmstelsel. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat intacte eiwitten en (biologisch actieve) eiwitfragmenten uit het voedsel opgenomen kunnen worden en in het lichaam een respons kunnen veroorzaken. Uit de literatuur zijn gegevens beschikbaar over biologische activiteit (na injectie) van bST fragmenten bij de mens.

Er is weinig bekend over het effect van bST behandeling op de uitscheiding van andere biologisch actieve stoffen (hormonen, zoals somatomedines, prolactine) in de melk. Daarnaast zijn weinig gegevens beschikbaar over het gehalte aan bST (en o.i.v. bST toediening veranderde gehalten van andere hormonen) in andere consumeerbare delen, zoals vlees.

Om een compleet beeld te krijgen van de veiligheid van produkten van met bST behandelde dieren voor de consument is verder onderzoek nodig. Met name de eiwitopname en de mogelijke aanleiding tot ontwikkeling van allergische en immuunreacties als gevolg van toepassing van recombinantprodukten behoeft nadere studie.

De bestaande analysetechnieken zijn te ongevoelig voor het nauwkeurig bepalen van bST gehalten in melk. Nader onderzoek zal moeten leiden tot een verbetering van de gevoeligheid. Daarnaast is een goede karakterisering van kruisreacties met andere, op bST gelijkende peptiden noodzakelijk. Beide aspecten zullen in een binnenkort te verschijnen notitie nader worden uitgewerkt.

Literatuur

Adibi, S.A. - Intestinal phase of protein assimilation in man. *Am.J. Clin.Nutr.* 29: 205-215, 1976

Adibi, S.A. - Role of small intestine in digestion of protein to amino acids and peptides for transport to portal circulation. In: *Nutrition and gastroenterology. Current concepts in nutrition Vol.9*, pp. 55-76; Winick, M. (ed.), Wiley, New York, USA, 1980

Alfaya, H., Schaeg, W. and Hoffmann, B. - Development of an enzyme-linked immunosorbent assay for the determination of bovine growth hormone (bGH). *Acta Endocrinol.* 114 (Suppl. 283): abstract 73, 1987

Andersson, R. - Immunological aspects of human growth hormone. *Acta Paediatr.Scand.* 325 (Suppl): 48-54, 1986

Bauman, D.E., Eppard, P.J., DeGeeter, M.J., Lanza, G.N. - Responses of high-producing dairy cows to long-term treatment with pituitary somatotropin and recombinant somatotropin. *J.Dairy Sci.* 68, 1352-1362, 1985a

Bauman, D.E., McCutcheon, S.N., Steinhour, W.D., Eppard, P.J. and Sechen, S.J. - Sources of variation and prospects for improvement of productive efficiency in the dairy cow: A review. *J.Anim.Sci.* 60, 583-575, 1985b

Bauman, D.E. and McCutcheon, S.N. - The effects of growth hormone and prolactin on metabolism. In: *Proc.VI Int.Symp. Ruminant Physiol. Control of digestion and metabolism in ruminants. September 12-14, 1984.* Milligan, L.P., Grovum W.L. and Dobson, A. (editors), Reston Book Publishing Co. Inc, Englewood Cliffs, New Jersey, U.S.A., pp 436-455, 1986

Bergental, D.M. and Lipsett, M.B. - Metabolic effects of human growth hormone and growth hormone of other species in man. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 20:1427-1436, 1960

Bienenstock J. Mucosal barrier functions. *Nutr.Rev.* 42, 105-108, 1984

Bitman, J., Wood, D.L., Tyrrell, H.F., Bauman, D.E., Peel, C.J., Brown, A.C.G. and Reynolds, P.J. - Blood and milk lipid responses induced by growth hormone administration in lactating cows. *J.Dairy Sci.*, 67, 2873-2880, 1984

Burvenich, C. - Rol van somatotropine (groeihormoon) tijdens de lactatie bij de herkauwers. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift* 52, 399-413, 1983

Cunningham-Rundles, C., Brandeis, W.E., Good, R.A. and Day, N.K.- Milk precipitins, circulating immune complexes and IgA deficiency. *Proc.Natl.Acad.Sci USA* 75: 3387-3389, 1975

Cunningham-Rundles, C. - Failure of antigen exclusion. In: Food allergy and intolerance. Brostoff, J. and Challacombe, S.J. (editors), Ballière-Tindall, London, U.K., pp. 223-236, 1987

Davis, S.R. and Bass, J.J. - Prospects for the stimulation of lactation and growth of ruminants by the administration of growth hormone and related molecules. Proc. New Zealand Soc. Anim. Prod. 44, 91-97, 1984

Davis, S.L., Ohlson, D.L., Klindt, J. and Anfinson, M.S. - Episodic growth hormone secretory patterns in sheep. Relationship to gonadal steroid hormones. Am. J. Physiol. E519-523, 1977

Elsair, J., Vairel, E., Gerbeaux, S., Dartois, A.M. and Royer, P. - Effects de l' hormone de croissance dans le nanisme hypothalamo-hypophysaire. II Etude des actions metaboliques de nouvelles preparations d' hormones de croissance bovine partiellement hydrolysee. Rev. Franc. d' Etudes Clin. Biol. 9: 614, 1964

Eppard, P.J. and Bauman, D.E. - The effect of long-term administration of growth hormones on performance of lactating cows. Proc. Cornell Nutr. Feed Manuf. pp 5-12, 1984

Eppard, P.J., Bauman, D.E. and McCutcheon, S.N. - Effect of dose of bovine growth hormone and lactation of dairy cows. J. Dairy Sci. 68, 1109-1115, 1985a

Eppard, P.J., Bauman, D.E., Bitman, J., Wood, D.L., Akers, R.M. and House, W.A. - Effect of dose of bovine growth hormone on milk composition: alfa-lactalbumin, fatty acids and minerals elements. J. Dairy Sci. 68, 3047-3054, 1985b

Fabry, J. Hormone de croissance en production latiaire. Cultivar 2000 202, 28-29, 1986

Farjam, A. et al. - Immunoaffinity precolumn for selective on line sample treatment in HPLC. I. Determination of 19-nortestosterone. In voorbereiding, manuscript ter publicatie in J. Chromatogr., 1988

Farries, E. und Profittlich, C. - Zum Einfluss von applizierten bovinum Somatotropin auf einige Stoffwechselformparameter bei der Milchkuh. 38th Ann. Meeting EAAP Lissabon, Sept. 28 - Oct. 1, 1987

Forsham, P.H., Li, C.H., DiRaimondo, V.C., Kolb, F.O., Mitchell, D. and Newman, S. - Nitrogen retention in man produced by chymotrypsin digests of bovine somatotropin. Metabolism 7: 762-764, 1958

Frank, T.J., Peel, C.J., Bauman, D.E. and Gorewit, R.C. - Comparison of different patterns of exogenous growth hormone administration on milk production in Holstein Cows. J. Anim. Sci. 57, 699-705, 1983

Gardner, M.L.G., Lindblad, B.S., Burston, D. and Matthews, D.M. - Trans-mucosal passage of intact peptides in the guinea-pig small intestine in vivo: a re-appraisal. Clin. Sci. 64, 433-439, 1983

- Gluckman, P.D., Breier, B.H. and Davis, S.R. - Physiology of the somatotrophic axis with particular reference to the ruminant. *J.Dairy Sci.* 70: 442-466, 1987
- Goodman Gilman, A., Goodman, L.S. and Gilman, A. - Goodman's and Gilman's the pharmacological basis of therapeutics, 6th edition, MacMillan Publ.Co., Inc., New York, U.S.A., 1980
- Gorewit, R.C. and Agyemang, K. - Serum growth hormone concentrations in high and low producing cows over lactation. 78th Ann. Meeting ADSA, June 26-29, 234, 1983
- Hart, I.C., Flux, D.S., Andrews, P. and McNeilly, A.S. - Radio-immunoassay for ovine and caprine growth hormone. Its application to the measurement of basal circulating levels of growth hormone in the goat. *Horm.Metab.Res.* 7: 35-40, 1975
- Hart, I.C., Bines, J.A., James, S. and Morant, S.V. - The effect of injecting or low doses of bovine growth hormone on milk yield, milk composition and the quantity of hormone in the milk serum of cows. *Anim.Prod.* 40, 243-250, 1985
- Hautefeuille, M., Brandl, V., Dumontier, A.M., Desieux, J.F. - In vitro effects of beta-casomorphins on ion transport in rabbit ileum. *Am.J.Physiol.* 250, G92-G97, 1986
- Knoppert, N.W. and Peters, R.H.M. - Effect van somatotropine op het farmaconmetabolisme bij herkauwers. Literatuuronderzoek. LDG-87/030, 1987
- Korenblat, R.E., Rothberg, R.M., Minden, P. et al. - Immune response of human adults after oral and parenteral exposure to bovine serum albumin. *J.Allergy* 41, 226-235, 1968
- Levine L.S., Sonenberg, M. and New, M.I. - Metabolic effects in children of a 37 amino acid fragment of bovine growth hormone. *J.Clin. Endocrinol.Metab.* 37, 607-615, 1973
- Liberti, J.P. and Miller, M.S. - Somatomedin-like effects of biologically active bovine growth hormone fragments. *Endocrinology* 103, 29-34, 1978
- Lorenson, M.Y., Robson, D.L. and Jacobs, L.S. - Detectability of pituitary prolactin and growth hormone by immunoassay is increased by thiols and suppressed by divalent cations. *Endocrinology* 112: 1880, 1983
- Krivi, G.G. and Rowold, E. Jr. - Antigenic regions of bovine somatotropin as defined by monoclonal antibodies. *Mol.Immunol.* 23: 1381-1389, 1986
- Machlin, L.J. - Effect of growth hormone on milk production and feed utilization in dairy cows. *J.Dairy Sci.* 56, 575-580, 1973

McCutcheon, S.N. and Bauman, D.E. - Effect of pattern of administration of bovine growth hormone on lactation performance of dairy cows. *J.Dairy Sci.* 69, 38-43, 1986a

McCutcheon, S.N. and Bauman, D.E. - Effect of pattern of administration of bovine growth hormone on lactation performance of dairy cows. *J.Dairy Sci.* 69, 38-43, 1986a

McCutcheon, S.N. and Bauman, D.E. - The application of hormones produced by recombinant DNA technology to increasing animal productivity. *Rev.Rural Sci.* 6, 131-140, 1986b

Mohammed, M.E. and Johnson, H.D. - Effect of growth hormone on milk yields and related physiological functions of Holstein cows exposed to heat stress. *J.Dairy Sci.* 68, 1123-1133, 1985

Moseley, W.M., Krabill, L.F. and Olsen, R.F. - Effect of bovine growth hormone administration in various patterns on nitrogen metabolism in the Holstein steer. *J.Anim.Sci.* 53, 1062-1070, 1982

Nadler, A.C., Sonenberg, M., New, M.I. and Free, C.A. - Growth hormone activity in man with components of tryptic digests of bovine growth hormone. *Metabolism* 16: 830-845, 1967

Ogra, P.L. and Karzon, D.T. - *Paed.Clin.North Amer.* 17: 385, 1970

Ohlsson, L., Isaksson, O. and Jansson, J.-O. - Endogenous testosterone enhances growth hormone (GH)-releasing factor-induced GH secretion in vitro. *J.Endocrinol.* 113, 249-253, 1987

Oldenbroek, J.K. en Garssen, G.J. - Onderzoek op het IVO: bST verbetert de efficiëntie van MA, Jersey en Zwartbont. *Boerderij (Suppl. Veehouderij)* 72, 10VE-13VE, 1987

Oldenbroek, J.K., Garssen, G.J., Forbs, A.B. and Jonker, L.J. - The effect of treatment of dairy cows of different breeds with recombinantly derived bovine somatotropin in a sustained delivery vehicle. 38th Ann. Meeting EAAP Lissabon, Sept. 28 - Oct. 1, 1987

Peel, C.J., Bauman, D.E. and Frank, T.J. - Role of growth hormone in regulating nutrient partitioning and increasing efficiency of milk production. *Proc.Cornell Nutr.Conf.Feed Manuf.* New York, pp 47-51, 1981a

Peel, C.J., Bauman, D.E., Gorewit, R.C. and Sniffin, C.J. - Effect of exogenous growth hormone on lactational performance in high yielding dairy cows. *J.Nutr.* 111, 1661-1671, 1981b

Peel, C.J., Frank, T.J., Bauman, D.E. and Gorewit, R.C. - Effect of endogenous growth hormone in early and late lactation on lactational performance of dairy cows. *J.Dairy Sci.* 66, 776-782, 1983

Peel, C.J., Sandler, L.d. Quelch, K.J. and Herington, A.C. - The effects of long-term administration of bovine growth hormone on the lactational performance of identical-twin dairy cows. *Anim.Prod.* 41, 135-142, 1985

Pocius, P.A. and Herbein, J.H. - Effect of in vivo administration of growth hormone on milk production and in vitro hepatic metabolism in dairy cattle. *J.Dairy Sci.* 69, 713-720, 1986

Richard, A.L., McCutcheon, S.N. and Bauman, D.E. - Responses of dairy cows to exogenous bovine growth hormone administered during early lactation. *J.Dairy Sci.* 68, 2385-2389, 1985

Rijkema, Y.S. - Effecten van toediening van somatotropine op de produktie van melkkoeien. Themadag "Mogelijkheden en consequenties van de toepassing van runder groei hormoon bij melkvee. Contactcommissie CCB en FT, Wageningen, 14 januari 1986

Rijkema, Y.S., Van Reeuwijk, L., Peel, C.J. and Mol, E.P. - Responses of dairy cows to long-term treatment with somatotropin in a prolonged release formulation. 38th Ann. Meeting EAAP Lissabon, Sept. 28 - Oct. 1, 1987

Rijkema, Y.S. en Van Reeuwijk, L. - bST-onderzoek op het IVVO: Zonder gezondheidsproblemen 18% meer melk. *Boerderij* (Suppl. Veehouderij) 72, 14VE-17VE, 1987

Scanes, C.G. - Growth hormone in domestic animals. Bovine somatotropin and methionyl somatotropin. Monstanto, 1984

Sonenberg, M., Free, C.A., Dellacha, J.M., Bonadonna, G., Haymowitz, A. and Nadler, A.C. - The metabolic effects in man of bovine growth hormone digested with trypsin. *Metabolism* 14: 1189-1213, 1965

Sonenberg, M., Kikutani, C.A., Free, C.A., Nadler, A.C. and Dellacha, J.M. - Chemical and biological characterization of clinically active tryptic digests of bovine growth hormone, *Ann.N.Y.Acad.Sci.* 148, 532, 1968

Stevenson, R.W., Stebbing, N., Rudman, C.G., Williams, P.E. and Cherrington, A.D. - The synthetic 32-46 fragment of human growth hormone increases insulin and glucagon levels in the conscious dog. *Metabolism* 36, 400-404, 1987

Tausk, M. - *Pharmakologie der Hormone*. Thieme Verlag, dritte überarbeitete Auflage, pp. 196-202, 1979.

Torkelson, A.R., Dwyer, K.A., Rogan, G.J. and Ryan, R.L. - Radioimmunoassay of somatotropin in milk from cows administered recombinant bovine somatotropin. *J.Dairy Sci.* 70 (suppl.1): 146, 1987

Van Dongen, P.A.M. - Uw eigen opiaten, *Janssen Medisch-Wetenschappelijk nieuws*, p. 281-286, 1987

Walker, W.A. - Absorption of protein and protein fragments in the developing intestine: role in immunologic/allergic reactions. *Pediatrics* 75 (Suppl.), 167-171, 1985

Warshaw, A.L., Walker, W.A. and Isselbacher, K.J. - Protein uptake by the intestine: evidence for absorption of intact macromolecules. *Gastroenterology* 66: 987-992, 1974



Wilson, S.J. and Walzer, M. - Absorption of undigested proteins in human beings. *Am.J.Dis.Child.* 50, 49-57, 1935