

5. Chamberlain K. W.: Vet. Clin. North Am. 4, 29, 1974.
6. Gross T. L., Ihrke P. J., Walder E. J.: Veterinary Dermatopathology. Mosby Vaar Brook, St. Louis, Missouri, 1992.
7. Guaguere E.: I Międzynar. Symp. Dermatolog. Puławy, 7-8.05.1994, s. 1-3.
8. Haliwell R. E. W.: Health nutrition and disease in clinical practice. Waltham Symposium, San Francisco 1990, p. 19.
9. Harvey J.: J. Small Anim. Pract. 32, 363, 1991.
10. Harvey R. G.: Vet. Rec. 128, 326, 1991.
11. Harvey R. G.: J. Small Anim. Pract. 34, 175, 1993.
12. Lewis L. D., Morris M. L., Hand M. S.: Small Animal Clinical Nutrition III. Mark Morris Associates, Topeka, Kansas, 1987.
13. Matsuda R., Nakamura R.: Trends Fd. Sci. 4, 289, 1993.
14. Merchant S. R., Taboada J.: Seminars Vet. Med. 6, 316, 1991.
15. Metcalfe D. D.: J. Allergy Clin. Immunol. 73, 749, 1984.
16. Monevet-Vautrin D. A., Grillios J. P.: Allergologie. Flammarion Medicine Sciences, Paris 1986.
17. Muller G. H., Kirk R. W., Scott D. W.: Small Animal Dermatology. W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 1989.
18. Pelczyńska E.: Medycyna Wet. 51, 253, 1995.
19. Pomorski Zb.: Badania nad wstrząsem i alergicznymi chorobami skóry u bydła oraz psów. Praca hab., AR Lublin, 1984.
20. Ready L. H., Miller Jr. W. H.: Allergic skin diseases of dogs and cats. W. B. Saunders, Philadelphia 1989.
21. Rosser E. J.: J. Am. vet. med. Ass. 203, 259, 1993.
22. Roudebush P., Corvell C. S.: Vet. Derm. 1, 23, 1992.
23. Walton G. S.: Allergic responses to ingested allergens. W: Kirk R. W.: Current Veterinary Therapy. W. B. Saunders, Philadelphia, Pennsylvania 1977.
24. Werner A., Harvey R. G.: Waltham Focus, 4, 11, 1995.
25. White S. D.: J. Am. vet. med. Ass. 188, 695, 1986.
26. White S. D., Sequoia D.: J. Am. vet. med. Ass. 194, 692, 1989.
27. Wilbur R. E., Ward G. W.: J. Allergy Clin. Immunol. 58, 306, 1970.
28. Wills J. M., Harvey R. G.: Aust. vet. J. 71, 322, 1994.

Adres autora: dr Wojciech Adamski, ul. Barytowa 19, 25-711 Kielce

LUCYNA KAŃSKA

artykuł przeglądowy

Hodowla zarodków ssaków *in vitro*

Zakład Fizjologii Rozrodu Zwierząt Instytutu Zootechniki, 32-083 Balice k. Krakowa

W ostatnich latach nastąpił znaczący postęp w pracach z zakresu biotechnologii rozrodu zwierząt. Stało się to głównie za sprawą dynamicznego rozwoju embriologii, tak eksperymentalnej jak i stosowanej. Jedną z technik znajdującą szerokie zastosowanie w tych pracach jest hodowla zarodków. Stosuje się ją zarówno w badaniach doświadczalnych, jako metodę oceny przeżywania zarodków poddanych mikromanipulacjom lub kriokonserwacji oraz w pracach aplikacyjnych, np. przy krótkotrwałym przechowywaniu zarodków lub ich uzyskiwaniu poprzez zapłodnienie *in vitro*.

Rozwój zarodków ssaków poza organizmem dawcy wymaga stworzenia warunków, które pozwolą na kolejne podziały mitotyczne prowadzące do utworzenia blastocysty, a więc najbardziej zaawansowanego, przedimplantacyjnego (u większości gatunków) stadium rozwoju zarodka. O rozwoju zarodka *in vitro* decydują takie cechy jak przynależność gatunkowa i osiągnięte stadium rozwoju, a także czynniki środowiskowe. Pewne ogólne wymogi odnoszące się do warunków środowiskowych obowiązują w każdym systemie hodowli *in vitro*.

Pierwsze udane próby hodowli *in vitro* zarodków przeprowadzono w latach 60-tych, jednakże pozwalały one na uzyskanie rozwoju zarodków tylko 2 gatunków ssaków, a mianowicie królika i myszy (6). Zarodki innych gatunków okazały się znacznie bardziej wymagające i rozwijały się jedynie w pojedynczych przypadkach (44) lub wykazywały ogra-

niczoną liczbę podziałów mitotycznych (2). Zahamowanie rozwoju następowało zwykle w określonym stadium krytycznym dla poszczególnych gatunków; i tak np., u szczura w 8-komórkowym; u chomika w 2- i 8-komórkowym; u owcy i krowy w 8-16-komórkowym; u świni w 4-komórkowym. Późniejsze badania doprowadziły do rozpoznania, że w tym krytycznym okresie rozwoju następuje transkrypcyjna aktywacja genomu zarodka, przejawiająca się w postaci jakościowych i ilościowych zmian w syntezie białka i RNA (8, 12, 22). Stosowane w tych przypadkach pożywki do hodowli *in vitro* nie zapewniały zatem dostatecznej ilości czy jakości substratów potrzebnych w tym okresie rozwoju zarodka.

Zarodki hodowane są w pożywkach złożonych lub o prostym składzie chemicznym, przy czym niektóre z prostszych pożywek okazały się bardziej przydatne (np. zmodyfikowany syntetyczny płyn jajowodowy SOF dla zarodków owczych i bydłych, a zmodyfikowany płyn Whittena dla zarodków świni). Dotychczas posiadamy, niestety, stosunkowo niewiele informacji nt. przydatności poszczególnych składników nieorganicznych pożywki (16, 47). Istotną rolę w pozaustrojowej hodowli zarodków odgrywa objętość pożywki, a także częstotliwość jej wymiany. Dowiedzono bowiem, że związki produkowane przez przedimplantacyjne zarodki działają stymulująco na ich własny rozwój (regulacja autokrynalna), a także regulują rozwój innych zarodków znajdujących się w tym samym naczynku do hodowli (regulacja pa-

rakrynalna) – zatem hodowla zarodków w grupie, w niewielkiej objętości pożywki, umożliwia oddziaływanie obydwu rodzajów regulacji (29, 33). Z drugiej jednak strony, metabolity, a szczególnie jony amonowe, gromadzące się w pożywce i osiągające toksyczny poziom już po 48 godz. hodowli, narzucają konieczność częściowej lub całkowitej wymiany pożywki w regularnych odstępach czasu (16).

Optymalny zakres pH pożywki mieści się w granicach 7,2 do 7,4, a osmolowość 276-316 mOs. Zarodki wydają się stosunkowo mało wrażliwe na wahania osmolowości roztworu w wymienionym przedziale, bowiem wyniki badań nad rozwojem zygot świni (5) wskazują, że raczej stężenie NaCl niż osmolowość decyduje o osiągnięciu stadium blastocysty.

Badania nad dodatkiem do pożywek związków energetycznych wykazały korzystny wpływ glukozy na rozwój zarodków, jakkolwiek stwierdzono, że bruzdkowanie może przebiegać również w pożywce zawierającej mleczan i/lub pirogronian, bez udziału glukozy (47). Wykazano występowanie różnic w metabolizmie glukozy zarówno między poszczególnymi stadiami rozwojowymi zarodka jak i między różnymi gatunkami. I tak, np. w przeciwieństwie do zarodków gryzoni, które nie metabolizują glukozy przed osiągnięciem stadium 8-komórkowego, a jej wysoki poziom wpływa wręcz negatywnie na metabolizm zarodka (19, 39), zarodki bydłce, począwszy od stadium 2-komórkowego, wykazują wzrastający stopniowo, wraz z rozwojem, metabolizm tego związku (7, 45). Natomiast w przypadku, gdy pożywka nie zawiera aminokwasów, a w jej skład wchodzi glukoza i fosforan, rozwój zarodków ulega zahamowaniu. Zygoty i wczesne stadia rozwojowe zarodków ludzkich, gryzoni i zwierząt domowych jako główne źródło energii wykorzystują pirogronian, a brak w pożywce pirogronianu i/lub mleczanu działa hamująco na ich rozwój (45).

Poziom dostępnych związków odżywczych w warunkach *in vivo* jest zależny od stadium rozwoju zarodka i wiążącego się z nim położenia w świetle dróg rodnych. W kolejnych odcinkach dróg rodnych obserwuje się zróżnicowane koncentracje poszczególnych związków. Koncentracja związków odżywczych może zależeć także od obecności komórek wzgórka jajonośnego, np. ludzkie i mysie komórki wzgórka produkują znaczne ilości mleczanu wokół oocytów i wczesnych stadiów rozwojowych zarodka (29). Natomiast stężenie tego związku w żeńskich drogach rodnych osiąga wartość około 5 mM (18), a więc *in vivo* rozwojowi zarodka towarzyszy stopniowo malejąca koncentracja mleczanu. Zatem przygotowując pożywki do kilkudniowych hodowli zarodków powinno się brać pod uwagę zmiany zachodzące w fizjologii zarodka i jego zróżnicowane, w zależności od stadium rozwoju, zapotrzebowanie na poszczególne związki odżywcze.

Hodowlę zarodków przeprowadza się w atmosferze 5% CO₂ w powietrzu lub mieszance gazowej o składzie CO₂: O₂: N₂. Doświadczenia prowadzone na zarodkach owczych i bydłych wskazują, że korzystniejszym wariantem (w przypadku hodowli bez współudziału komórek somatycznych) jest użycie mieszanki gazowej, w której zawartość tlenu jest zredukowana do 5%, a więc mieszanki o składzie 5% CO₂ + 5% O₂ + 90% N₂ (31, 47).

Obecnie istnieje możliwość uzyskania rozwoju zarodków przy użyciu jednego z trzech systemów hodowli, a mianowicie: 1. hodowla *in vivo*, w jajowodzie biorczyni pośredniej (homologicznym lub heterologicznym); 2. hodowla *in vitro* we współhodowli z komórkami somatycznymi; 3. hodowla *in vitro* w samej pożywce.

W 1955 r. Averill i wsp. (1) wykazali zdolność zarodków owczych do rozwoju po przeniesieniu do jajowodu biorczyni pośredniej – królicy. Możliwość ta była wykorzystywana dla potrzeb transportu zarodków na znaczne odległości, jest również niekiedy stosowana dla uzyskania rozwoju zarodków otrzymanych w wyniku zapłodnienia *in vitro* (11). Biorczynią pośrednią zarodków bydłych może być krowa, owca lub królik. Zabieg ten jest jednak kosztowny i kłopotliwy, gdyż wymaga dwukrotnej interwencji chirurgicznej, a ponadto znaczna część komórek jest gubiona w trakcie tych manipulacji (25). Z tych powodów prowadzono intensywne badania nad znalezieniem metody pozwalającej na kilkudniową hodowlę zarodków w warunkach *in vitro*.

Momentem przełomowym dla opracowania metod hodowli *in vitro* było zastosowanie współhodowli z komórkami somatycznymi – pozwoliło ono na pokonanie bloku rozwojowego zarodka (15, 23, 27, 28). Istotą tej koncepcji jest założenie, że hodowane komórki somatyczne, wykazując podobny typ aktywności jaki przejawiają te same komórki *in vivo*, mogą dostarczać dzielącym się zarodkom potrzebnych metabolitów i specyficznych stymulatorów wzrostu (11) lub też ich działanie ogranicza się do roli „odtruwającej”, polegając na inaktywacji substancji toksycznych, będących produktami metabolicznymi hodowanych komórek (3). Takim toksycznym metabolitem (powstającym jako końcowy produkt metabolizmu aminokwasów) okazał się jon amonowy (NH₄), który osiągając koncentrację 150 μM zahamowuje rozwój blastocyst, a już 75 μM blokuje bruzdkowanie (16).

Prowadzone są hodowle zarodków z zastosowaniem różnych rodzajów komórek somatycznych, tj. pęcherzy trofoblastycznych, komórek nabłonka jajowodu, komórek ziarnistych pęcherzyka jajnikowego, komórek *endometrium* macicznego, z fibroblastami pochodzącymi z jąder buhaja, z komórkami wątroby szczura, z fibroblastami płodowymi czy wreszcie z komórkami owodni. Współhodowla zarodków z komórkami ziarnistymi oraz komórkami

nabłonka jajowodowego bywa stosowana najczęściej dla zarodków wczesnych stadiów rozwojowych, natomiast fibroblasty stosuje się we współhodowli z morulami i blastocystami (11, 15, 27, 28).

Ostatnio coraz częściej stosuje się współhodowlę zarodków bydłych z komercyjnie dostępnymi liniami mrożonych komórek wątroby szczura (Buffalo rat liver cells = komórki BRL), które zachowują zdolności wspomaganie rozwoju zarodków nawet po kilkunastu pasażach (22, 35, 46). Niewątpliwą zaletą użycia do współhodowli kriokonserwowanych komórek jest standaryzacja warunków hodowli. Podobny warunek zostaje spełniony gdy używa się do współhodowli kriokonserwowane komórki nabłonka jajowodowego, jednak w tym przypadku nie można stosować pasaży (28). Wykazano, że komórki BRL syntetyzują i wydzielają tzw. czynnik przeciwbiałaczkowy (LIF = leukemia inhibiting factor; 17, 40) oraz inne biologicznie aktywne substancje (10, 43). dodatek LIF do hodowli pierwotnych komórek zarodkowych pozwalał na ich wielokrotne pasażowanie (34), a w przypadku zarodków zwiększał ich zdolności do rozwoju *in vitro* (12).

Mimo, że zastosowanie współhodowli zarodków z komórkami somatycznymi zdecydowanie poprawia zdolności rozwojowe to jednak uważa się, że taki system hodowli nie jest w pełni zdefiniowany i uniemożliwia badania fizjologii zarodka. Z najnowszych prac wynika, że istnieje możliwość prowadzenia efektywnej hodowli od stadium zygoty do blastocysty w samej pożywce, bez komórek somatycznych, a nawet bez dodatku surowicy (16).

Z badań porównawczych nad rozwojem *in vitro* zygot bydłych w różnych systemach hodowli wynika, że pożywka SOF (syntetyczny płyn jajowodowy) uzupełniona surowicą ludzką (28, 47) lub aminokwasami (16, 20, 45) może być z powodzeniem stosowana w hodowli *in vitro* zygot stanowiąc alternatywną metodę hodowli do współhodowli z komórkami nabłonka jajowodu bydłego czy komórkami BRL.

W przypadku hodowli zarodków bez współdziałania komórek somatycznych czynnikiem wyraźnie wpływającym na rozwój zarodka jest rodzaj użytego białka. Wykazano szczególnie korzystny wpływ surowicy ludzkiej (w porównaniu z innymi surowicami czy albuminą) na liczbę zarodków osiagających stadium blastocysty (28, 47).

Surowica zawiera szereg peptydów, białek i wiele innych związków. Część tych związków nie występuje jednak w płynie jajowodowym i macicznym, a więc w naturalnym środowisku, w którym rozwija się zarodek (18). Badania nad rolą surowicy w hodowli zarodków zwierząt domowych wykazały, że mimo korzystnego wpływu na odsetek zarodków osiagających bardziej zaawansowane stadia rozwoju, tj. stadium moruli i blastocysty, obecność surowicy

w pożywce może oddziaływać negatywnie na morfologię, metabolizm, ultrastrukturę i rozwój poimplantacyjny zarodków. Stwierdzono bowiem, że zarodki rozwijające się w pożywce zawierającej surowicę wykazują obecność wakuoli lipidowych w blastomerach, których nie obserwuje się w zarodkach rozwijających się *in vivo* lub hodowanych *in vitro* w pożywce o zdefiniowanym składzie chemicznym (20). W efekcie zmian w metabolizmie zarodka hodowanego w obecności surowicy obserwuje się znaczny wzrost produkcji mleczanu prowadzący do ograniczenia zdolności życiowych zarodka (21), a badania ultrastruktury wykazały zmiany degeneracyjne w mitochondriach (9). Ponadto uważa się, że dodatek surowicy do pożywki nie pozwala na standaryzację warunków hodowli, bowiem każda seria surowicy jest unikalną mieszaniną metabolitów, hormonów i czynników wzrostu (16).

Ostatnio coraz większe znaczenie przypisuje się czynnikom wzrostu (białka o ciężarze molekularnym mniejszym niż 30 000, które są syntetyzowane lokalnie i oddziałują na tkanki na zasadzie regulacji autokrynalnej lub parakrynalnej), których obecność stwierdzono w płynie jajowodowym. W świetle żeńskich dróg rodnych wykazano obecność insuliny, insulino-podobnego czynnika wzrostu I, epidermalnego czynnika wzrostu, transformującego wzrost czynnika α oraz czynnika przeciwbiałaczkowego LIF (38). Czynniki te, działając mitogennie, regulują wzrost i rozwój wczesnych zarodków. Stwierdzono, że ekspresja receptorów dla poszczególnych czynników wzrostu, także ich wiązanie zależy od stadium rozwoju zarodka (48), ponadto wykazano korelację między stężeniem czynnika wzrostu a rozwojem zarodka *in vitro* (26).

Najnowsze badania wskazują, że dodatek aminokwasów do pożywki wpływa korzystnie na rozwój zarodków gryzoni (5, 16), a także zwierząt gospodarskich (20, 45). Aminokwasy są bowiem obecne w płynie jajowodowo-macicznym (32), a także, jako związki endogenne, zostały stwierdzone w oocytach i zarodkach (37).

Reasumując, w ostatnich latach uzyskano ogromny postęp w rozwoju metod pozaustrojowej hodowli zarodków ssaków. Ocena efektywności metod hodowli zarodków zarówno zwierząt laboratoryjnych jak i gospodarskich wskazuje, że istnieje możliwość uzyskania rozwoju *in vitro* nawet powyżej 80% zarodków. Niemniej jednak, szczególnie w przypadku zwierząt gospodarskich, odsetek zarodków osiagających bardziej zaawansowane stadia rozwoju przedimplantacyjnego, tj. stadium moruli i blastocysty, a także podejmujących rozwój poimplantacyjny (po przeniesieniu do dróg rodnych biocyf) ulega zdecydowanej redukcji i nawet w najbardziej optymalnych warunkach nie przekracza na ogół 40% wyjściowej liczby hodowanych zygot. Zarodki hodowane *in vitro* wykazują również obniżoną, w po-

równaniu z zarodkami nie hodowanymi, podatność na kriokonserwację (41). Wspomniane ograniczenia narzucają zatem konieczność dalszych badań nad doskonaleniem metod hodowli. Niemniej jednak uzyskiwana wydajność pozwala już na wykorzystywanie pozaustrojowych metod hodowli zarodków w wielu pracach z zakresu biotechnologii rozrodu.

Piśmiennictwo

1. *Averill R. W., Adams C. E., Rowson L. E.*: Nature, London 176, 167, 1955.
2. *Bavister B. D.*: Studies on the developmental blocks in cultured hamster embryos. W: The Mammalian Preimplantation Embryo. Regulation of Growth and Differentiation in Vitro. Plenum Press, New York, 1987, s. 219.
3. *Bavister B. D., Rose-Hellekant T. A., Pinyopummintr T.*: Theriogenology 37, 127, 1992.
4. *Bavister B. D., McKiernan S. H.*: Regulation of hamster embryo development in vitro by amino acids. W: Preimplantation Embryo. Development. Plenum Press, New York, 1992, s. 57.
5. *Beckman L. S., Day B. N.*: Theriogenology 39, 611, 1993.
6. *Biggers J. D.*: Pioneering mammalian embryo culture. W: The Mammalian Preimplantation Embryo. Regulation of Growth and Differentiation in Vitro. Plenum Press, New York, 1987, s. 1.
7. *Brackett B. G., Zuelke K. A.*: Theriogenology 39, 43, 1993.
8. *Crosby I. M., Gandolfi F., Moor R. M.*: J. Reprod. Fert. 62, 575, 1988.
9. *Dorland M., Gardner D. K., Trounson A. O.*: J. Reprod. Fert. Abstr. Ser. 13, 70, 1994.
10. *Dulak N. C., Temi H. M.*: J. Cell Physiol. 81, 153, 1973.
11. *Eyestone W. H., First N. L.*: J. Reprod. Fert. 85, 715, 1989.
12. *Frei R. E., Schultz G. A., Church R. B.*: J. Reprod. Fert. 86, 637, 1989.
13. *Fry R. C.*: Reprod. Fert. Dev. 4, 449, 1992.
14. *Galli C., Lazzari G.*: Proc. Eur. Conf. Embryo Techn. Genet. Engin. Cattle Sheep, Kraków 1994, s. 111.
15. *Gandolfi F., Moor R. M.*: J. Reprod. Fert. 81, 23, 1987.
16. *Gardner D. K.*: Cell Biol. Intern. 18, 1163, 1994.
17. *Gough N. M., Williams R. L.* i wsp.: Reprod. Fert. Dev. 1, 281, 1989.
18. *Gardner D. K., Lane M.*: Embryo culture systems. W: Handbook of In Vitro Fertilization, CRC Press, Boca Raton, 1993, s. 85.
19. *Gardner D. K., Lane M.*: Biol. Reprod. 49, Suppl. 1, 152, 1993.
20. *Gardner D. K., Lane M., Spitzer A., Batt P. A.*: Biol. Reprod. 50, 390, 1994.
21. *Gardner D. K., Sakkas D.*: Hum. Reprod. 8, 288, 1993.
22. *Hawk H. W., Wall R. J.*: Theriogenology 41, 1585, 1994.
23. *Heyman Y., Menezo Y.* i wsp.: Theriogenology 27, 59, 1987.
24. *Hyttel P., Grondahl C.* i wsp.: Arch. Tierz., Berlin 33, 517, 1990.
25. *Jura J., Kopchick J. J.* i wsp.: Theriogenology 41, 1226, 1994.
26. *Kaye P. L., Bell K. L.* i wsp.: Reprod. Fert. Dev. 4, 373, 1992.
27. *Kątska L.*: Zapłodnienie in vitro dojrzałych in vivo i in vitro oocytów bydłych. Praca hab., Instytut Zootechniki, Kraków.
28. *Kątska L., Ryńska B., Smorąg Z.*: Theriogenology 43, 859, 1995.
29. *Lane M., Gardner D. K.*: Hum. Reprod. 7, 558, 1992.
30. *Leese H. J., Barton A. M.*: J. Exp. Zool. 234, 231, 1985.
31. *Liu Z., Foote R. H.*: Biol. Reprod. 53, 786, 1995.
32. *Miller J. G. O., Schultz G. A.*: Biol. Reprod. 36, 125, 1987.
33. *Paria B. C., Dey S. K.*: Proc. Natl Acad. Sci. USA 87, 4756, 1990.
34. *Pease S., Braghetta P.* i wsp.: Dev. Biol. 141, 344, 1990.
35. *Rehman N., Collins A. R., Suh T. K., Wright R. W. Jr.*: Theriogenology 41, 1453, 1994.
36. *Rexroad C. E. Jr., Powell A. M.*: Theriogenology 29, 387, 1988.
37. *Schultz G. A., Kaye P. L., McKay D. J., Johnson M. H.*: J. Reprod. Fert. 61, 387, 1981.
38. *Schultz G. A., Heyner S.*: Growth factors in preimplantation mammalian embryos. W: Oxford Reviews of Reproductive Biology, Oxford University Press, 1993, s. 43.
39. *Seshagiri P. B., Bavister B. D.*: Mol. Reprod. Devel. 30, 105, 1991.
40. *Smith A. G., Hooper M. L.*: Dev. Biol. 121, 1, 1987.
41. *Smorąg Z., Gajda B.*: Anim. Reprod. Sci. 26, 151, 1991.
42. *Streffer C., Beuningen D. van* i wsp.: Cell Tissue Kinet. 13, 135, 1980.
43. *Temin H. M., Smith G. L., Dulak N. C.*: Control of multiplication of normal and rous sarcoma virus-transformed chicken embryo fibroblasts by purified multiplication-stimulating activity with nonsuppressible insulin-like and sulfation factors activities. W: Control of Proliferation in Animal Cells, t. 1, Cold Spring Harbor, 1974, s. 19.
44. *Tervit H. R., Whittingham D. G., Rowson L. E. A.*: J. Reprod. Fert. 30, 492, 1972.
45. *Trounson A., Pushett D.* i wsp.: Theriogenology 41, 57, 1994.
46. *Voelkel S. A., Hu Y. X.*: Theriogenology 37, 1117, 1992.
47. *Walker S. K., Heard T. M., Seamark R. F.*: Theriogenology 37, 111, 1992.
48. *Watson A. J., Hogan A.* i wsp.: Reprod. Dev. 31, 87, 1992.

Adres autora: doc. dr hab. Lucyna Kątska, ul. Rejtana 8 m. 4, 30-510 Kraków

EUROVET GUIDE 1996-1997

– jest to przewodnik instytucji i organizacji weterynaryjnych w Europie, wydany nakładem wydawnictwa francuskiego Les Éditions du Point Vétérinaire, o objętości 480 stron. W treści zawarte są liczne rozdziały ułożone wg następującego układu: instytucje i organizacje Unii Europejskiej, stowarzyszenia europejskie i międzynarodowe, organizacje i instytucje krajów Unii Europejskiej oraz nie należących do wym. Unii. W tej ostatniej grupie jest także Polska.

W sprawie nabycia – w cenie 295,- franków francuskich (1FF = ok. 0,54 n. zł) – należy się zwracać na adres: Karin de Lange DVM, 9 rue Alexandre B. P. 233, 94702 Maisons-Alfort cedex, Francja.

