Artykuł przeglądowy *Review*

Autofagia w przebudowie gruczołu mlekowego bydła

MAŁGORZATA GAJEWSKA, BARBARA GAJKOWSKA*,
AGNIESZKA SOBOLEWSKA, TOMASZ MOTYL

Katedra Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa
*Instytut Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN, ul. Pawińskiego 5, 02-106 Warszawa

Gajewska M., Gajkowska B., Sobolewska A., Motyl T.

Autophagy in the remodeling of bovine mammary glands

Summary

Autophagy is a process responsible for the degradation and recycling of cytoplasmic content by lysosomes. It is thought to facilitate cell survival during periods of nutrient starvation, but it can also be involved in other physiological processes including regulation of protein homeostasis, degrading intracellular bacteria, tumor suppression and regulation of programmed cell death. Our group was the first to report autophagy in bovine mammary epithelial cells, both in vitro, on BME-UV1 mammary epithelial cell line, and in vivo. The highest intensity of autophagy in bovine mammary glands is noted during dry periods, when the gland undergoes intensive involution and the deprivation of bioactive compounds (hormones, growth factors, cytokines) and nutrients occur. Our studies on the regulation of autophagy show that the conditions observed during bovine mammary gland involution, such as: 1) decrease in the release of lactogenic hormones and growth factors (prolactin, GH and IGF-I); 2) increase of apoptogenic factors (i.e. TGF-β_1) and their receptors, 3) increased synthesis of sex steroids (17-β estradiol, progesterone); and 4) the enhanced competition of intensively developing fetus and mother organism for nutritional and bioactive compounds, may create a state of temporary malnutrition of mammary epithelial cells that forces the cells to the induction of autophagy as a mechanism stabilizing intracellular supplies of energy and aminoacids, especially during the enhanced activity of apoptogenic factors.

Keywords: autophagy, mammary gland

Czym jest autofagia?

Autofagia jest procesem komórkowym mającym na celu degradację białek o długim okresie półtrwania oraz usuwanie organelli komórkowych przy udziale lizosomów (10). W komórkach eukariotycznych wyróżniono trzy główne formy autofagii: makroautofagię, mikroautofagię oraz autofagię z udziałem białek opiekuńczych – chaperonów. W komórkach ssaków makroautofagia jest główną ścieżką odpowiedzialną za nieselektywne przenoszenie materiału cytoplazmatycznego do lizosomów podczas głodu komórkowego oraz biorącą udział w usuwaniu mitochondriów i peroksysomów, dlatego w dalszej części tekstu określenie „autofagia" będzie odniesieniem właśnie do tego procesu. Podczas autofagii składniki cytoplazmy mające ulec degradacji zostają otoczone początkowo pojedynczą, a następnie podwójną błoną izolującą, tworząc 1 μm średnicy autofagosomy, które następnie ulegają fuzji z lizosomami (ryc. 1). Prowadzi to do powstania autofagolizosomów, w których zachodzi ostateczny proces niszczenia ich zawartości przy użyciu hydrolaz lizosomalnych (19).

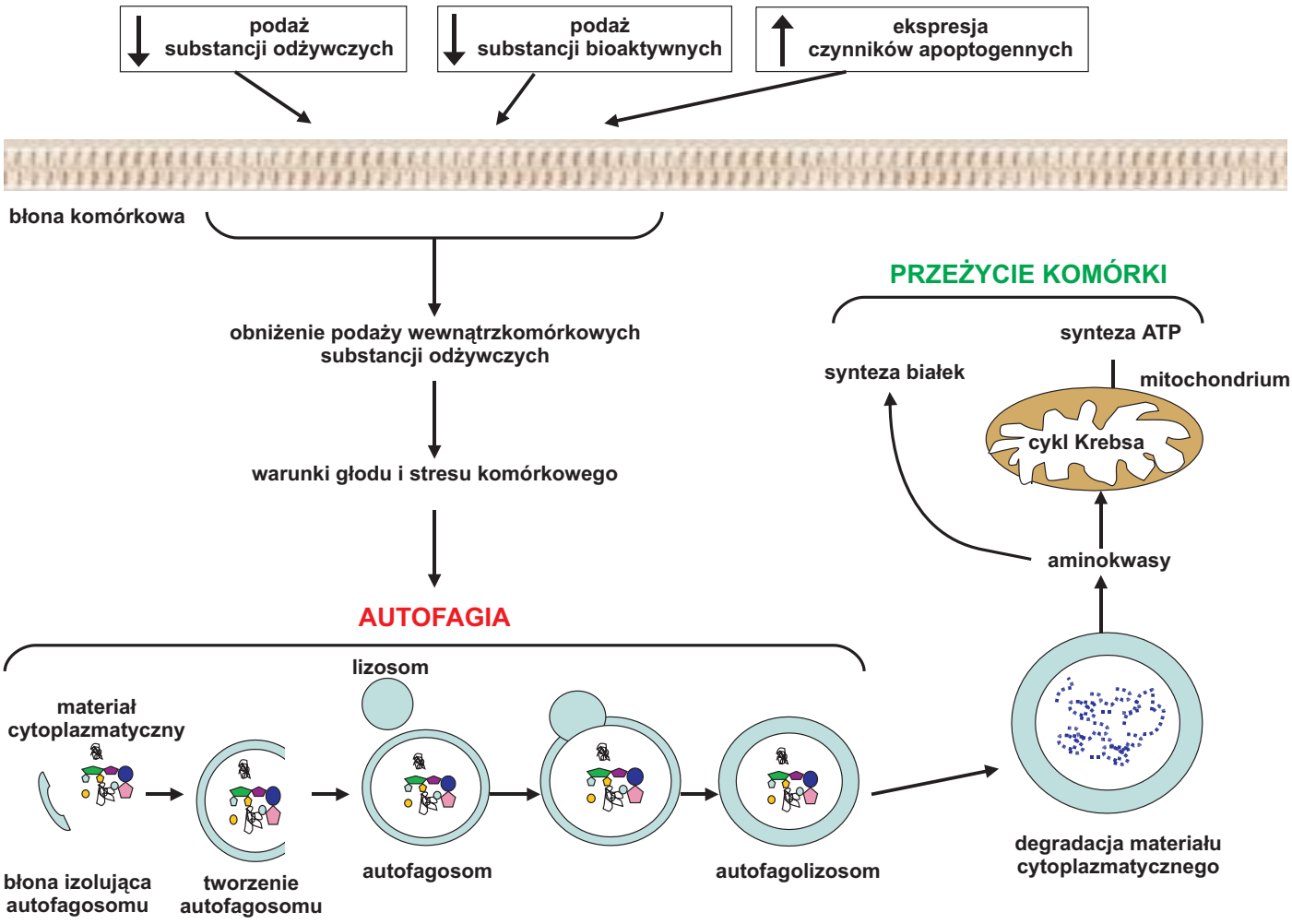
Białka zaangażowane w regulację procesu autofagii w komórkach wszystkich organizmów począwszy od drożdży, aż po ssaki należą do produktów genów z rodziny ATG (AuTophaGy-related) (11, 13). Za jeden z najdokładniejszych markerów autofagii w komórkach uważa się białko Atg8, u ssaków zwane LC3. Białko LC3, w nieaktywnej formie, zwanej LC3-I, pozostaje rozproszone w cytoplazmie, natomiast aktywowane przekształca się w formę zwaną LC3-II i przemieszcza się do błony izolującej wczesnego autofagosomu. Dzięki swej specyficznej lokalizacji na błonach autofagosomalnych białko LC3-II jest uznawane za specyficzny marker aktywnych autofagosomów i/lub autofagolizosomów. Konstrukt LC3 z białkiem zielonej fluorescencji (GFP – green fluorescence protein) opisany przez Mizushimę i wsp. (15) pozwala na wykorzystanie naturalnej fluorescencji GFP do lokalizacji autofagosomów w komórce przy użyciu mikroskopu fluorescencyjnego oraz ilościowej analizy cytometrycznej. Innym białkiem zaagngażowanym w przebieg procesu autofagii, używanym jako marker tego procesu jest beklina1. Beklina1 jest niezbędna w transporcie wakuolarnym (12) oraz uczestniczy w formowaniu kompleksu z kinazą 3-fosfatydyloinozytolu klasy III (PI3K klasy III), biorącą udział w powstawaniu autofagosomów (8). Bierze też udział w sekwestracji materiału cytoplazmatycznego do wakuoli autofagicznych.

Głównymi funkcjami autofagii są: adaptacja komórek w przypadku głodzenia, poprzez rozkład białek umożliwiający dostarczenie aminokwasów i innych składników niezbędnych do utrzymania metabolizmu, oraz umożliwienie zachowania homeostazy cytoplazmy, przez kontrolę procesu usuwania peroksysomów, mitochondriów oraz regulację wielkości siateczki śródplazmatycznej. Z racji swych funkcji coraz częściej uważa się, iż autofagia jest procesem ułatwiającym komórkom przeżycie w organizmach wielokomórkowych. Jest ona inicjowana przez czynniki stresogenne, np. ograniczenie składników odżywczych, hipertermię, hipoksję czy zmiany pH (16), jednakże ostatnie dowody wskazują, że autofagia jest również nierozłącznie związana z fizjologią komórki (4, 16). Inicjowanie autofagii jest pod kontrolą kinazy mTOR (mammalian target of rapamycin). Ścieżka sygnałowa z udziałem PI3 kinazy/kinazy białkowej B (PKB)/mTOR jest niezbędna dla proliferacji, przeżycia oraz migracji komórek (24). Zaburzenia regulacji tej ścieżki stwierdzone zostały w wielu typach raka (20), a hamowanie szlaku PI3K/PKB/mTOR uważane jest za możliwą skuteczną strategię w leczeniu różnorodnych nowotworów (23). W warunkach fizjologicznych kinaza mTOR jest również wyłączana podczas głodu komórkowego oraz hipoksji, co w konsekwencji prowadzi do nasilenia procesu autofagii (11).

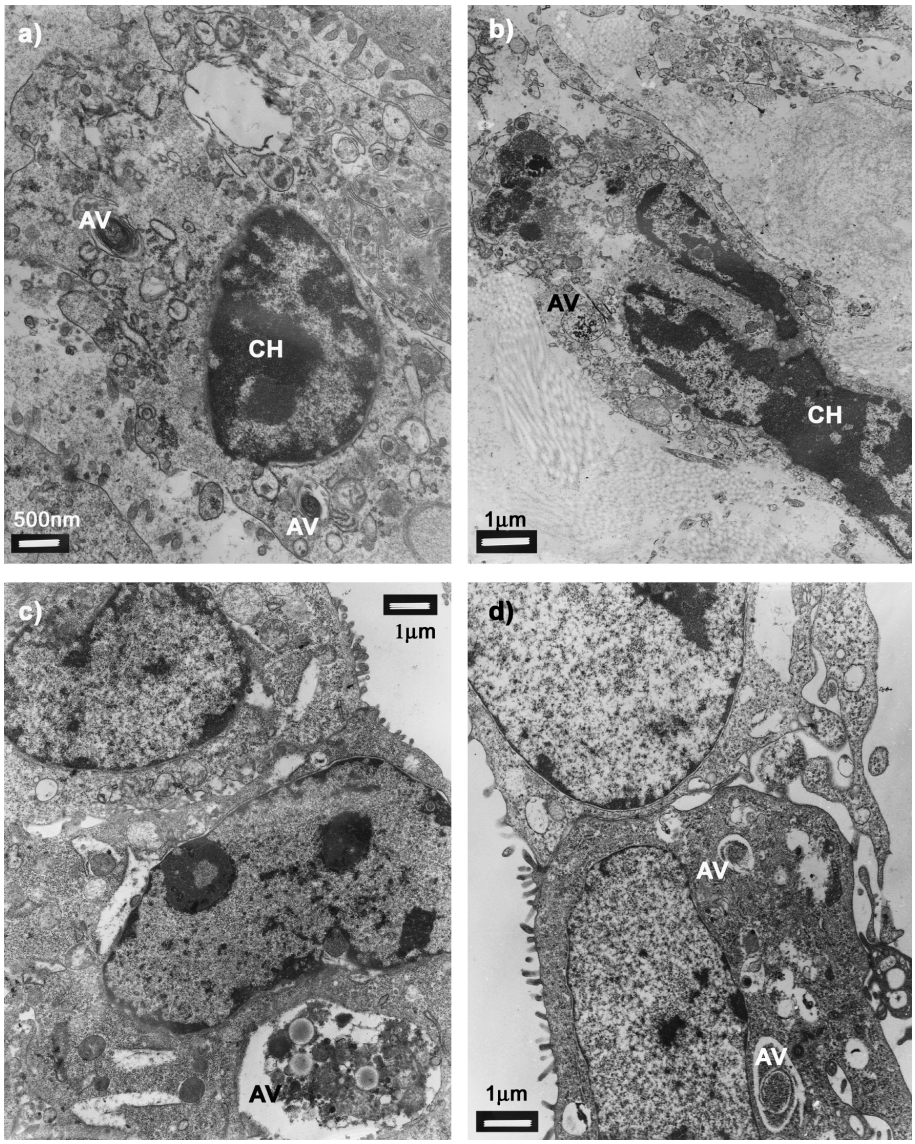
Rola autofagii w gruczole mlekowym

Autofagia jest charakterystyczna dla komórek bogatych w cytoplazmę, a takie cechy budowy mają komórki nabłonka gruczołu mlekowego. Ponadto gruczoł mlekowy podlega intensywnym przekształceniom strukturalnym oraz funkcjonalnym w czasie cyklu laktacyjnego. Cechy te mogą predysponować gruczoł mlekowy do inicjowania procesu autofagii w warunkach stresu komórkowego.

Przebudowa gruczołu mlekowego jest procesem fizjologicznym, związanym z panującą tam dynamiczną równowagą pomiędzy dwoma jednocześnie zachodzącymi procesami mitozy i programowanej śmierci komórek nabłonka gruczołu mlekowego. Podczas rozwoju gruczołu mlekowego, w czasie ciąży następuje wzmożona proliferacja tzw. komórek macierzystych nabłonka (epithelial stem cells) (22). Ponadto dochodzi do różnicowania komórek nabłonkowych, wydłużania i rozgałęziania przewodów mlekowych, wzrostu liczby pęcherzyków wydzielniczych oraz powsta-



Ryc. 1. Schemat indukcji oraz przebiegu autofagii jako narzędzia przeżycia komórki (opracowany na podstawie schematu autorstwa Levine B., Yuan J.: J. Clin. Invest. 2005, 115, 2679-2688)



Ryc. 2. Fotografie z transmisyjnego mikroskopu elektronowego ukazujące charakterystyczne cechy ultrastrukturalne autofagii w eksplantatach gruczołu mlekowego krowy w okresie zasuszania (a, b) oraz w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła linii BME-UV1 (c, d). Fot. a i b przestawiają fragmenty gruczołu mlekowego, zawierającego komórki nabłonka gruczołowego posiadające widoczne wakuole autofagiczne (AV) oraz wykazujące kondensację chromatyny (CH), świadczącą o zachodzącym równoczesnie procesie apoptozy w tych komórkach; fot. c przedstawia komórki linii BME-UV1 traktowane TGF-β1 przez 12 godzin – zaznaczona komórka posiada dużą wakuolę autofagiczną (AV); fot. d przedstawia komórki linii BME-UV1 poddawane głodzeniu przez 24 godziny, poprzez zredukowanie ilości FBS w pożywce – zaznaczona komórka posiada widoczne wakuole autofagiczne (AV)

wania typowej zrazikowo-pęcherzykowej struktury narządu, umożliwiającej wytwarzanie odpowiednio dużej ilości mleka w czasie laktacji. Badania prowadzone na trójwymiarowym modelu *in vitro* ludzkich komórek nabłonka gruczołu sutkowego linii MCF-10A wykazały występowanie autofagii wraz z procesem apoptozy w komórkach znajdujących się w tworzącym się świetle pęcherzyków (14). Z kolei nasz zespól badawczy po raz pierwszy opisał występowanie autofagii z charakterystycznymi cechami morfologicznymi (autofagosomy i autofagolizosomy) i biochemicznymi (wzrost ekspresji białek LC3 oraz bekliny1) w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła zarówno *in vitro* (5), jak i *in vivo* (29). Wyniki cytowanych badań skłoniły nas do bardziej szczegółowego poznania roli autofagii w procesie przebudowy gruczołu mlekowego bydła, jak również sposobu jej regulacji.

Znany jest fakt, iż w okresie zasuszania gruczołu mlekowego bydła, trwającym 6-8 tygodni, dochodzi do przebudowy tego narządu, polegającej na inwolucji tkanki gruczołowej z następującym wzrostem nowej tkanki wydzielniczej. Proces inwolucji gruczołu mlekowego bydła zachodzi wolniej niż u gryzoni, struktura pęcherzykowa zachowana jest przez kilka tygodni, a laktacja może być wznowiona po 4 tygodniach zasuszania (3). Zmiany ultrastrukturalne w komórkach nabłonkowych obserwowane są w 48 godzin po zakończeniu laktacji, a następnie w ciągu 2-3 tygodni w tkance gruczołowej wymienia bydła dochodzi do zmniejszenia się światła pęcherzyków, podczas gdy powierzchnia tkanki łącznej ulega zwiększeniu. Od 28. dnia pozostałe zapadnięte struktury pęcherzykowe są wyraźnie mniejsze niż w czasie laktacji, lecz generalnie struktura pęcherzykowa pozostaje zachowana przez cały okres inwolucji. Ten typ inwolucji nazywany jest inwolucją regeneracyjną, będącą efektem niemal jednocześnie zachodzących procesów: mammogenezy stymulowanej hormonami ciążowymi oraz inwolucji starej tkanki, która uwarunkowana jest intensywną śmiercią komórek wydzielniczych. Inwolucja tkanki gruczołowej u przeżuwaczy sięga jedynie 40%, w przeciwieństwie do gryzoni, gdzie procesowi temu ulega aż 90% tkanki wydzielniczej. Inicjacja procesu inwolucji u przeżuwaczy wiąże się z zahamowaniem pobierania mleka lub zaprzestaniem udoju na początku okresu zasuszania, co prowadzi do gwałtownych zmian w tkance gruczołowej. Dochodzi do spadku wydzielania hormonów laktogennych (prolaktyny, hormonu wzrostu, insulinopodobnego czynnika wzrostowego: IGF-I) oraz wzrostu ekspresji lokalnych, wewnątrzgruczołowych czynników o charakterze induktorów programowanej śmierci komórek, takich jak białka wiążące IGF-I (IGFBP's), FAS-L czy transformujący czynnik wzrostowy – beta1 (TGF-β1) (26-28).

Utrata komórek podczas procesu inwolucji gruczołu mlekowego spowodowana jest występowaniem nasilonego procesu apoptozy, obserwowanego u przeżuwaczy w okresie zasuszania (25). Badania własne wykazały, iż również autofagia występuje w gruczole mlekowym bydła w największym nasileniu w fazie zasuszania, co manifestowało się wysoką ekspresją bekliny1 w tej fazie oraz obecnością komórek o charakterystycznych morfologicznych cechach autofagii (autofagosomy, autofagolizosomy) (17, 18, 29). Ponadto stwierdzono obecność komórek wykazujących jednocześnie cechy morfologiczne apoptozy (m.in. marginacja i kondensacja chromatyny) oraz autofagii (autofagosomy i autofagolizosmomy) (ryc. 2). Znany jest fakt, iż w warunkach długotrwałego stresu autofagia może sama prowadzić do śmierci komórek, pomagając w usunięciu nieodwracalnie uszkodzonych struktur w celu utrzymania spójności i homeostazy tkanki oraz narządu. Z tego względu wielu badaczy klasyfikuje autofagię jako typ II programowanej śmierci komórki, nazywając jednocześnie apoptozę programowaną śmiercią typu I. Autofagię należy jednak traktować przede wszystkim jako proces ochronny oraz wczesną odpowiedź komórkową na czynniki apoptogenne. Sekwestracja mitochondriów do wakuol autofagicznych może chronić komórki przed uwalnianiem czynników proapoptotycznych (cytochrom c, AIF, Smac/DIABLO, Omi/HtrA2). W tym wypadku autofagia umożliwia komórkom ucieczkę przed apoptozą (1). W przypadku, gdy proces ten przestaje być skuteczny, proapoptotyczne czynniki pochodzące z mitochondriów mogą aktywować programowaną śmierć typu I. Ponadto stwierdzono wzajemne powiązania ścieżek sygnałowych apoptozy i autofagii. Przejawem interakcji pomiędzy autofagią a apoptozą jest możliwa aktywacja programowanej śmierci typu I poprzez aktywność lizosomów (2, 9). Wyniki badań innych autorów wskazują na istnienie białek wspólnych dla apoptozy i autofagii, takich jak: ASP (apoptosis-specific protein) (6), beklina1 (12), kinazy śmierci regulowane przez Ca2+/kalmodulinę (DAPK i DRP-1) (7) oraz białka z rodziny Bcl-2 (21). Czynnikiem, który powoduje, iż autofagia z procesu chroniącego komórki w warunkach stresu przekształca się w typ II programowanej śmierci, jest prawdopodobnie stopień nasilenia procesu degradacji składników komórkowych. Obserwacje budowy ultrastrukturalnej komórek nabłonka gruczołu mlekowego linii BME-UV1, eksponowanych na działanie proapoptotycznego czynnika TGF-β1 (5), oraz tkanek gruczołowych bydła (29) wykazały współistnienie apoptozy i autofagii w tym narządzie. Wyrazem tego było jednoczesne występowanie w tych samych komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła cech typowych dla apoptozy i autofagii (ryc. 2). Jest to prawdopodobnie reakcja wtórna komórki (failsafe response), występująca w warunkach długotrwale utrzymującego się wpływu czynnika lub czynników apoptogennych, w których komórka nie może dłużej bronić się przed apoptozą poprzez ochronny mechanizm autofagii. Na możliwość indukowania autofagii poprzez czynniki apoptogenne wskazują również wyniki badań Zarzyńskiej i wsp. (29), która wykazała, iż wraz z nasileniem apoptozy i autofagii w zasuszanych gruczołach mlekowych krów dochodziło również do wzrostu ekspresji TGF-β1 oraz jego receptora (TGF-βRII) w tkance gruczołowej. Wskazuje to na możliwą istotną rolę tej cytokiny w indukcji obydwu procesów.

Badania własne wskazują na istotną rolę ścieżki somatotropowej w kontrolowaniu autofagii w gruczole mlekowym bydła. Wykazano, iż IGF-I oraz EGF znoszą efekt autofagiczny w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego linii BME-UV1, hodowanych w warunkach głodu komórkowego (dane niepublikowane). Efekt głodu komórkowego wywoływano poprzez redukcję stężenia płodowej surowicy bydlęcej (FBS – fetal bovine serum) w pożywce, ze standardowej koncentracji 10% do 0,5%. Taki model doświadczalny nazwano modelem inwolucji *in vitro*, ponieważ naśladował on ograniczenie podaży substancji odżywczych oraz biologicznie aktywnych w gruczole mlekowym podczas zasuszania. W celu większego przybliżenia tego modelu inwolucji *in vitro* do warunków fizjologicznych występujących w organizmie ciężarnej samicy wprowadzono do pożywki hodowlanej, ubogiej w FBS, steroidy płciowe (17-β estradiol oraz progesteron). Uzasadnieniem tego eksperymentu był fakt, iż końcowy okres ciąży u krów przypada na fazę zasuszania gruczołu mlekowego. Badania te wykazały, iż obydwa stosowane hormony steroidowe wywołują zwiększenie aktywacji lizosomów w komórkach nabłonka gruczołu mlekowego bydła linii BME-UV1, aczkolwiek mechanizm tego efektu na poziomie molekularnym pozostaje nieznany.

Regulacja autofagii w gruczole mlekowym bydła

Podsumowując wyniki badań nad rolą i regulacją autofagii w gruczole mlekowym bydła, prowadzonych w ciągu ostatnich kilku lat przez zespół Katedry Nauk Fizjologicznych Wydziału Medycyny Weterynaryjnej SGGW, należy stwierdzić, iż zasuszanie gruczołu mlekowego jest okresem sprzyjającym nasileniu procesu autofagii. Zjawisko to wynika ze spadku wydzielania hormonów podtrzymujących laktację (hormon wzrostu, IGF-I) oraz ekspresji ich receptorów w gruczole; wzrostu ekspresji czynników apoptogennych, m.in. TGF-β1, zwiększonej syntezy steroidów płciowych (17-β estradiolu oraz progesteronu) oraz zwiększonego współzawodnictwa o substancje bioaktywne i odżywcze ze strony intensywnie rozwijającego się płodu. Podane czynniki mogą kreować stan przejściowego niedożywienia komórek gruczołowych, zmuszając komórki do indukcji autofagii, jako mechanizmu mobilizującego wewnątrzgruczołowe rezerwy aminokwasowe i energetyczne, szczególnie w obliczu nasilenia wpływu czynników o działaniu apoptotycznym.

Piśmiennictwo

1. *Bauvy C., Gane P., Arico S., Codogno P., Ogier-Denis E.*: Autophagy delays sulindac sulfide-induced apoptosis in human intestinal colon kancer cell line HT-29. Exp. Cell. Res. 2001, 268, 139-149.
2. *Boya P., Gonzalez-Polo R. A., Poncet D., Andreau K., Vieira H. L., Roumier T., Perfettini J. L., Kroemer G.*: Mitochondrial membrane permeabilization is a critical step of lysosome-initiated apoptosis induced by hydroxychloroquine. Oncogene 2003, 22, 3927-3936.
3. *Capuco A. V., Akers R. M.*: Mammary involution in diary animals. J. Mammary Gland Neoplasia. 1999, 4, 137-144.
4. *Cuervo A. M.*: Autophagy: in sickness and in health. Trends Cell Biol. 2004, 14, 70-77.
5. *Gajewska M., Gajkowska B., Motyl T.*: Apoptosis and autophagy induced by TGF-β1 in bovine mammary epithelial BME-UV1 cells. J. Physiol. Pharmacol. 2005, 56, 143-157.
6. *Hammond E. M., Brunet C. L., Johnson G. D., Parkhill J., Milner A. E., Brady G., Gregory C. D., Grand R. J. A.*: Homology between a human apoptosis specific protein and the product of APG5, a gene involved in autophagy in yeast. FEBS Lett. 1998, 425, 391-395.
7. *Inbal B., Bialik S., Sabanay I., Shani G., Kimchi A.*: DAP kinase and DRP-1 mediate membrane blebbing and the formation of autophagic vesicles during programmed cell death. J. Cell Biol. 2002, 157, 455-468.
8. *Kihara A., Kabeya Y., Ohsumi Y., Yoshimori T.*: Beclin-phosphatidylinositol 3 - kinase complex functions at the trans-Golgi network. EMBO Rep. 2001, 2, 330-335.
9. *Lamparska-Przybysz M., Gajkowska B., Motyl T.*: Cathepsins and BID are involved in the molecular switch between apoptosis and autophagy in breast cancer MCF-7 cells exposed to camptothecin. J. Physiol. Pharmacol. 2005, 56, 159-179.
10. *Lemasters J. J., Qian T., He L., Kim J. S., Elmore S. P., Cascio W. E., Brenner D. A.*: Role of mitochondrial inner membrane permeabilization in necrotic cell death, apoptosis and autophagy. Antioxid. Redox. Signal. 2002, 4, 769-781.
11. *Levine B., Klionsky D. J.*: Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. Develop. Cell 2004, 6, 463--477.
12. *Liang X. H., Kleeman L. K., Jiang H. H., Gordon G., Goldman J. E., Berry G., Herman B., Levine B.*: Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. J. Virol. 1998, 72, 8586--8596.
13. *Meijer A., Codogno P.*: Regulation and role of autophagy in mammalian cells. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004, 36, 2445-2462.
14. *Mills K. R., Reginato M., Debnath J., Queenan B., Brugge J. S.*: Tumor necrosis factor related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) is required for induction of autophagy during lumen formation in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci. 2004, 101, 3438-3443.
15. *Mizushima N.*: Methods for monitoring autophagy. Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004, 36, 2491-2502.
16. *Moore M. N., Allen J. I., Somerfield P. J.*: Autophagy: role in surviving environmental stress. Mar. Environ. Res. 2006, 62, 420-425.
17. *Motyl T., Gajkowska B., Zarzyńska J., Gajewska M., Lamparska-Przybysz M.*: Apoptosis and autophagy in mammary Gland remodeling and breast cancer chemotherapy. J. Physiol. Pharm. 2006a, 57, 17-32.
18. *Motyl T., Zarzyńska J., Gajewska M., Gajkowska B.*: Regulacja programowanej śmierci komórki w przebudowie gruczołu mlekowego bydła. Folia Univ. Agric. Stetin., Zootech. 2006b, 250, 57-66.
19. *Ohsumi Y.*: Molecular dissection of autophagy: two ubiquitin-like systems. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2001, 2, 211-216.
20. *Sekulic A., Hudson C. C., Homme J. L., Yin P., Otterness D. M., Karnitz L. M., Abraham R. T.*: A direct linkage between the phosphoinositide 3-kinase-AKT signaling pathway and the mammalian target of rapamycin in mitogen--stimulated and transformed cells. Cancer Res. 2000, 60, 3504-3513.
21. *Shimizu S., Kanaseki T., Mizushima N., Mizuta T., Arakawa-Kobayashi S., Thompson C. B., Tsujimoto Y.*: Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. Nat. Cell Biol. 2004, 6, 1221-1228.
22. *Smith G. H., Chepko G.*: Mammary epithelial stem cells. Micr. Res. Technique 2001, 52, 190-203.
23. *Vivanco I., Sawyers C. L.*: The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. Nat. Rev. Cancer 2002, 2, 489-501.
24. *Vogt P. K.*: PI 3-kinase, mTOR, protein synthesis and cancer. Trends Mol. Med. 2001, 7, 482-484.
25. *Waręski P., Motyl T., Ryniewicz Z., Orzechowski A., Gajkowska B., Wojewódzka U., Płoszaj T.*: Expression of apoptosis-related proteins in mammary gland of goat. Small Rum. Res. 2001, 40, 279-289.
26. *Wilde C. J., Knight C. H., Flint D. J.*: Control of milk secretion and apoptosis during mammary involution. J. Mammary Gland Biol. Neoplasia 1999, 4, 129-136.
27. *Zarzyńska J., Motyl T.*: Molekularny mechanizm inwolucji gruczołu mlekowego krowy. Medycyna Wet. 2005, 61, 1110-1113.
28. *Zarzyńska J., Gajewska M., Motyl T.*: Effects of hormones and growth factors on TGF-β1 expression in bovine mammary epithelial cells. J. Diary Res. 2005, 72, 39-48.
29. *Zarzyńska J., Gajkowska B., Wojewódzka U., Dymnicki E., Motyl T.*: Apoptosis and autophagy in involuting bovine mammary gland is accompanied by up-regulation of TGF-β_1 and suppression of somatotropic pathway. Polish J. Vet. Sci. 2007, 10, 1-9.

Adres autora: dr Małgorzata Gajewska, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa; e-mail: gajewska_knf@yahoo.pl