

Analiza apoptozy w komórkach limfocytów krwi obwodowej u chorych na raka piersi i raka jajnika

Analysis of apoptosis in peripheral blood cells from breast and ovarian cancer patients

Elżbieta Kozłowska¹, Hanna Romanowicz-Makowska¹, Marek Zadrozny², Joanna Mankiewicz³, Krzysztof Szyłło⁴, Beata Smolarz¹, Tomasz Pertyński⁵, Andrzej Kulig¹

Cel. Apoptotyczna śmierć komórek odgrywa istotną rolę w patogenezie i progresji nowotworów. W obecnej pracy badano związek pomiędzy częstością występowania apoptozy w komórkach limfocytów krwi obwodowej a progresją raka piersi i raka jajnika.

Materiały i metody. Proces apoptozy był analizowany u chorych na raka piersi ($n = 22$) i raka jajnika ($n = 19$). Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet, u których nie stwierdzono choroby nowotworowej ($n = 20$). Uszkodzenia DNA w postaci charakterystycznych dla apoptozy „drabinek apoptotycznych” były wykrywane przy zastosowaniu techniki elektroforezy w żelu agarozowym.

Wyniki. Uszkodzenia DNA zostały zidentyfikowane u 82% (18/22) kobiet chorych na raka piersi i u 63% pacjentek z rakiem jajnika (12/19). Liczba pozytywnych przypadków była znacząco wyższa wśród próbek rakowych niż kontrolnych ($P < 0,05$). Dodatkowo, wykazano statystycznie znaczące różnice ($p < 0,05$) w obecności apoptozy pomiędzy grupami o różnym stopniu zaawansowania nowotworów.

Wniosek. Wysoka częstość apoptozy w limfocytach krwi obwodowej w raku piersi i jajnika sugeruje potencjalną rolę tego zjawiska dla występowania i progresji nowotworów.

Słowa kluczowe: apoptoza, rak piersi, rak jajnika, elektroforeza w żelu agarozowym, marker prognostyczny

(Przegląd Menopauzalny 2002; 4: 25–30)

¹ Pracownia Biologii Molekularnej, Zakład Patomorfologii Klinicznej ICZMP w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. Andrzej Kulig

² Klinika Chirurgii Onkologicznej ICZMP w Łodzi, p.o. kierownika: dr n. med. Marek Zadrozny

³ Zakład Ekologii Stosowanej, Uniwersytet Łódzki, kierownik: prof. zw. Maciej Zalewski

⁴ Katedra Ginekologii Operacyjnej ICZMP w Łodzi, kierownik dr n. med. Krzysztof Szyłło

⁵ Klinika Ginekologii i Chorób Menopauzy ICZMP w Łodzi, kierownik: prof. dr hab. med. Tomasz Pertyński



Wstęp

Apoptoza jest genetycznie uwarunkowanym procesem fizjologicznym, polegającym na zmianach biochemicznych i morfologicznych komórek, które prowadzą poprzez proteolityczną i nukleolityczną degradację składników komórki do jej śmierci. Obecnie wiadomo, że występowanie i rozwój nowotworów jest wynikiem nie tylko nagromadzenia się w komórkach zmian genetycznych, powstałych w konsekwencji nadekspresji lub mutacji protoonkogenów, czy też utraty lub zmian genów supresorowych. Za równie istotny czynnik w tych procesach uważa się obniżenie zdolności komórek do prawidłowego przeprowadzania programu aktywnej śmierci – apoptozy, jako odpowiedzi na bodźce pochodzące z otaczającego środowiska [12, 34].

Proces apoptozy jest bardzo częstym zjawiskiem, zarówno w raku piersi, jak i w raku jajnika [1, 7, 15, 18]. W przypadku tych nowotworów znanych jest obecnie wiele czynników prognostycznych, do których można zaliczyć: typ histologiczny raka, rozmiar guza, stan węzłów chłonnych pachowych, stopień złośliwości histologicznej, stopień proliferacji komórek rakowych, ploidię DNA – czyli zawartość DNA w komórkach raka, wiek chorej, receptory steroidowe, biomarkery inwazyjności: aktywatory i inhibitory plazminogenu oraz receptory czynników wzrostu o aktywności kinazy tyrozynowej [5, 11, 17]. Wymienione czynniki nie dają jednakże pełnego obrazu biologii nowotworu.

Wiadomo, że uwolnienie się komórek spod prawidłowego mechanizmu ich umierania odgrywa ważną rolę w patogenezie i progresji zarówno raka jajnika [1, 2, 18, 32], jak i raka piersi [14, 18, 31]. Kluczową rolę w regulacji apoptozy w jej fazie decyzyjnej odgrywają białka z rodziny Bcl-2 [22, 23, 28, 36]. Mogą one zatem stanowić markery dla rozwoju tego procesu. Rodzinę Bcl-2 dzieli się na 3 podrodziny: podrodzinę Bcl-2 (np. występujące u ssaków Bcl-2, Bcl-xl, Bcl-xs, A1), podrodzinę Bax (Bax, Bak, Bok) oraz podrodzinę BH3 (Bad, Bik, Bid). Białka z podrodziny Bcl-2 (z wyjątkiem Bcl-xs) są inhibitorami apoptozy, natomiast białka z podrodziny Bax i BH3 są promotorami aktywnej śmierci komórek.

W raku piersi redukcja ekspresji genu *bax* koreluje ze złą odpowiedzią na chemioterapię i krótszym czasem przeżycia [16, 26, 27, 29]. Podwyższony poziom białka Bcl-2 może stanowić niezależny czynnik prognostyczny w przypadku raka jajnika III° zaawansowania [1, 2].

W obecnej pracy analizowano związek pomiędzy częstością apoptozy w komórkach limfocytów krwi obwodowej wykrywanej przez klasyczną elektroforezę w żelu agarozowym a progresją raka piersi i jajnika.

Materiał i metody

Pacjentki z rakiem piersi. Krew do badań została uzyskana od 22 kobiet z rakiem piersi, u których stwierdzo-

no obecność ($n = 12$) lub brak przerzutów ($n = 10$) do okolicznych węzłów chłonnych. Krew pobrano od 10 kobiet w wieku przedmenopauzalnym (średnia wieku $\pm$ SD 41,33 $\pm$ 4,72 lat) i od 12 kobiet w wieku pomenopauzalnym (średnia wieku $\pm$ SD 65,33 $\pm$ 7,66 lat). Średni rozmiar guza wynosił 20 mm (17–32 mm). Wszystkie nowotwory były klasyfikowane wg skali Scarffa-Blooma-Richardsona [6, 24]. W badaniach wykorzystano 7 przypadków nowotworów I°, 9 II° i 6 III° zaawansowania.

Pacjentki z rakiem jajnika. Krew do badań została pobrana od 19 kobiet z rakiem jajnika w wieku pomenopauzalnym. Pacjentki mieściły się w przedziale wiekowym 59–82 lat (średnia wieku $\pm$ SD 66,43 $\pm$ 6,68 lat). Wszystkie nowotwory sklasyfikowano wg kryteriów ustalonych przez FIGO (ang. *International Federation of Gynaecology and Obstetrics*). Do analizy wykorzystano 5 przypadków nowotworów I°, 10 II° i 4 III° zaawansowania.

Grupa kontrolna. Jako kontrolę zastosowano krew uzyskaną od kobiet ($n = 20$), u których nie stwierdzono występowania choroby nowotworowej.

Izolowanie DNA

Genomowy DNA był izolowany z limfocytów krwi obwodowej, pobieranej na cytrynian. Krew była traktowana roztworem lizującym (155 mM NH_4Cl , 10 mM KHCO_3 i 1 mM EDTA, pH 7,4) a następnie buforem ekstrahującym (10 mM Tris-HCl, 100 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5% SDS i 0,1 mg/ml proteinaza K, pH 8,2) w 57°C, przez całą noc. DNA był wytrącany roztworem 1,5 M NaCl i etanolem. Po przemyciu 70% etanolem, próbka była rozpuszczana w wodzie i stężenie DNA zostało określone poprzez pomiar absorbancji przy długości fali $\lambda = 260$ nm. Trzy mikrogramy DNA zostały poddane elektroforezie w 1% żelu agarozowym, z użyciem buforu elektroforetycznego TBE (0,09 M Tris-borate, 2 mM EDTA, pH 8,3). Elektroforeza została przeprowadzona z zastosowaniem napięcia 5 V/cm. Żel był barwiony bromkiem etydydny w stężeniu 1 mg/ml i oglądany w świetle UV (ryc. 1.).

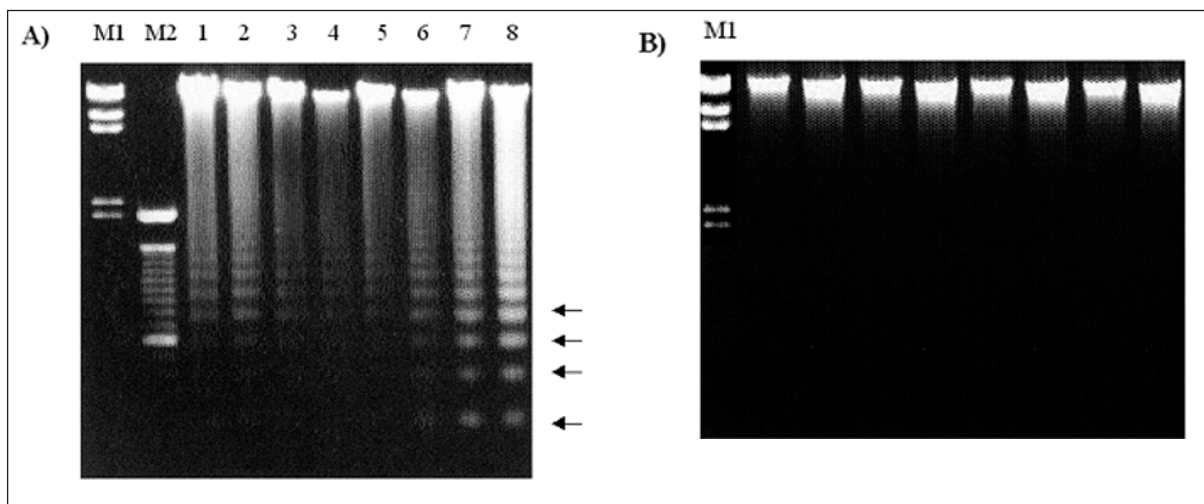
Analiza statystyczna

Żaden z parametrów odnoszących się do materiału nowotworowego nie podlegał rozkładowi normalnemu (test Smirnowa-Kolmogorova) i dlatego dla analizy wyników zastosowano testy nieparametryczne. $P < 0,05$ było traktowane jako wynik statystycznie znaczący.

Wyniki

Częstość apoptozy u chorych na raka piersi i w kontroli została przedstawiona w tab. I. 18 z 22 próbek rakowych (82%) charakteryzowało się obecnością apoptotycznych uszkodzeń DNA w limfocytach krwi obwodo-





Ryc. 1. Elektroforeza w żelu agarozowym DNA uzyskanego z limfocytów krwi obwodowej pobranych od chorych na raka piersi i jajnika (ryc. A.) i od grupy kontrolnej (ryc. B.).

Charakterystyczne dla procesu apoptozy drabinki apoptotyczne (ryc. A.) zostały oznaczone strzałkami; w ścieżkach 1–4 u chorych na raka piersi; w ścieżkach 5–8 u chorych na raka jajnika. M1 - marker długości par zasad lambda-HindIII (Qiagen, Hilden, Germany), M2 - marker długości par zasad - 100 bp ladder (Qiagen, Hilden, Germany)

Tab. I. Częstość apoptozy w grupie chorych na raka piersi i w grupie kontrolnej

Pacjentki z rakiem piersi (n = 22)		Grupa kontrolna (n = 20)	
apoptoza		apoptoza	
obecność	brak	obecność	brak
18 (0,82) ^a	4 (0,18)	3 (0,15)	17 (0,81)

^a $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą

Tab. II. Częstość apoptozy w grupie chorych na raka jajnika i w grupie kontrolnej

Pacjentki z rakiem jajnika (n = 19)		Grupa kontrolna (n = 20)	
apoptoza		apoptoza	
obecność	brak	obecność	brak
12 (0,63)	7 (0,37)	3 (0,15)	17 (0,81)

^a $P < 0,05$ w porównaniu z kontrolą

wej, natomiast tylko 3 z 17 przypadków kontrolnych (15%) wykazywało fragmentację DNA. Obecność *drabinek apoptotycznych* w komórkach rakowych była wyższa niż w komórkach prawidłowych ($P < 0,05$). Wśród apoptotycznie pozytywnych próbek 10 pochodziło od kobiet w wieku przedmenopauzalnym i 8 od kobiet w wieku pomenopauzalnym. Analiza częstości apoptozy pomiędzy tymi grupami wykazała brak statystycznie istotnych różnic (test Mann-Whitney U, $P = 0,051$).

Wyniki analizy apoptozy w limfocytach krwi obwodowej u chorych na raka jajnika przedstawiono w tab. II. Z 19 przypadków raka jajnika, 12 (63%) wykazywało fragmentację DNA. W próbkach kontrolnych częstość apoptozy była niższa ($P < 0,05$) niż w nowotworach.

Zależność rozkładu częstości apoptozy od stopnia zaawansowania nowotworu określonego wg skali Scarfa-Blooma-Richardsona dla chorych na raka piersi i wg skali FIGO dla chorych na raka jajnika przedstawiają odpowiednio tab. III. i IV. Stwierdzono statystycznie istotne różnice pomiędzy stopniem apoptozy w podgrupach o różnym stopniu zaawansowania nowotworów ($P < 0,05$).

Dyskusja

Aktywna śmierć komórki towarzyszy organizmowi od początku jego rozwoju w okresie embriogenezy, morfogenezy, jak również jest podstawą do prawidłowego funkcjonowania dojrzałego organizmu. Apoptoza w przeciwieństwie do martwicy (nekrozy) [8, 12, 13, 25] jest aktywną śmiercią komórki, wymagającą w swoim przebiegu syntezy RNA i białka. Apoptozę można podzielić na 2 etapy:

- 1) w pierwszym dochodzi do indukcji procesu samounicestwienia komórki, poprzez odebranie sygnałów zewnątrz- i wewnątrzkomórkowych,
- 2) w drugim etapie następuje uaktywnienie genów, których produkty biorą udział w procesie apoptozy. Apoptoza jest zjawiskiem zachodzącym w przypadku nowotworów i wydaje się mieć istotne znaczenie dla ich występowania [13]. Hamowanie



Tab. III. Apoptoza u chorych na raka piersi^a o różnym stopniu zaawansowania nowotworu

stopień ^b	I (n = 7)		II (n = 9)		III (n = 6)	
apoptoza	liczebność	częstość	liczebność	częstość	liczebność	częstość
brak	3	0,43	7	0,78	1	0,16
obecność	4	0,57	2	0,22	5	0,84

^an = 22; ^bwg skali Scarfa-Blooma-Richardsona

Tab. IV. Apoptoza u chorych na raka jajnika^a o różnym stopniu zaawansowania nowotworu

stopień ^b	I (n = 5)		II (n = 10)		III (n = 4)	
apoptoza	liczebność	częstość	liczebność	częstość	liczebność	częstość
brak	2	0,40	6	0,60	1	0,25
obecność	4	0,60	4	0,40	3	0,75

^an = 19; ^bwg skali FIGO

apoptozy w raku może wpływać na jego wzrost i promować progresję [29].

Proces apoptozy może być kontrolowany przez mechanizmy wewnątrzkomórkowe, które wydają się być zależne od białka p53, lub przez czynniki zewnętrzne takie jak hormony, cytokiny i leki antynowotworowe [16, 19–21]. W raku piersi defekt w ekspresji mRNA *bax* oraz białka Bax jest kluczowym promotorem apoptozy [4]. Przywrócenie ekspresji genu *Bax* w liniach komórkowych raka piersi hamuje rozwój nowotworu [3] i podwyższa czułość terapii cytostatykami [33, 35]. W liniach komórkowych redukcja ekspresji *Bax* jest negatywnym czynnikiem prognostycznym w nie-hodkinowskich chłoniakach [10], raku jajnika [9] i raku trzustki [30]. p53, oraz kombinacja działania p53 i Bcl-2, reprezentują niezależny czynnik prognostyczny w raku jajnika III° zaawansowania. Oprócz ich roli w procesie apoptozy, p53 i Bcl-2 nie wydają się być klinicznie użytecznymi markerami predykcyjnymi odpowiedzi na chemioterapię u tych pacjentek [2].

Aby stwierdzić fakt, czy komórki nowotworowe od chorych na raka piersi i jajnika podlegają kontroli poprzez proces apoptozy, genomowy DNA był izolowany z krwi uzyskanej od chorych leczonych w Instytucie Centrum Zdrowia Matki Polki w Łodzi. Analizę DNA prowadzono z zastosowaniem klasycznej elektroforezy

w żelu agarozowym. Ryc. 1. przedstawia wynik uzyskany w przypadku pacjentek (ryc. A.) i osób zdrowych (ryc. B.), gdzie nie wykryto fragmentacji DNA. 82% pacjentek z rakiem piersi i 63% kobiet z rakiem jajnika reprezentowało uszkodzenia DNA charakterystyczne dla procesu apoptozy; 3 z 17 próbek kontrolnych (15%) charakteryzowało się zmianami apoptotycznymi, jednak nie na tę skalę, co w przypadku grup badanych.

Przeprowadzone analizy histologiczne wskazują na dobrą korelację pomiędzy III° zaawansowania nowotworów a liczbą komórek apoptotycznych. 84% chorych na raka piersi ze stopniem III nowotworu oraz 75% pacjentek z rakiem jajnika (stopień III) wykazywało apoptozę w komórkach limfocytów (tab. III.). Pacjenci z I° zaawansowania nowotworu charakteryzowali się lepszym czasem przeżycia niż pacjenci stopnia II i III.

Wykrywanie apoptozy przy zastosowaniu elektroforezy w żelu agarozowym polega na określaniu stopnia fragmentacji DNA [25]. W obecnej pracy wykazano, że apoptoza może być z sukcesem wykrywana w limfocytach krwi obwodowej przy użyciu powyższej metody. Przeprowadzone wstępne analizy sugerują, że proces apoptozy może być związany z występowaniem i/lub progresją raka piersi i jajnika. Jednakże kolejne badania, obejmujące większą populację chorych są konieczne dla potwierdzenia tego przypuszczenia.

Summary

Purpose: Apoptotic cell death plays a central role in the pathogenesis and disease progression of cancers. In present work we investigated the association between presence of apoptotic peripheral blood cells and breast and ovarian cancer progression.



Materials and methods. The apoptosis was analysed in blood cells of breast ($n = 22$) and ovarian cancer patients ($n = 19$). Blood samples from age matched healthy women served as control ($n = 20$). The apoptotic peripheral blood cells were detected by agarose gel electrophoresis.

Results. The apoptotic cells were identified in 82% (18/22) of the breast cancers and in 63% ovarian cancer patients (12/19). The number of positive samples were significantly higher among cancer samples than among control samples ($P < 0.05$). Additionally, there were significant differences ($P > 0.05$) in presence of apoptosis between subgroups assigned to histological stage.

Conclusion. The high frequency of apoptotic peripheral blood cells in breast and ovarian tumours suggests a potential role of apoptosis in cancers appearance and/or progression.

Key words: apoptosis, breast cancer, ovarian cancer, agarose gel electrophoresis, prognostic marker

Piśmiennictwo

1. Baekelandt M, Holm R, Nesland JM, et al. Expression of apoptosis-related proteins is an independent determinant of patient prognosis in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 2000, 18, 3775-81.
2. Baekelandt M, Kristensen GB, Nesland JM, et al. Clinical significance of apoptosis related factors p53, Mdm2, and Bcl-2 in advanced ovarian cancer. *J Clin Oncol*, 1999, 17, 2061.
3. Bargou RC, Daniel PT, Mapara MY, et al. Expression of the bcl-2 gene family in normal and malignant breast tissue: low bax-alpha expression in tumor cells correlates with resistance towards apoptosis. *Int J Cancer*, 1995, 60, 854-9.
4. Bargou RC, Wagener C, Bommert K, et al. Overexpression of the death-promoting gene bax-alpha which is downregulated in breast cancer restores sensitivity to different apoptotic stimuli and reduces tumour growth in SCID mice. *J Clin Invest*, 1996, 97, 2651-9.
5. Berek JS, Fu YS, Hacker NF. Ovarian cancer. In: Berek JS, Adashi EY, Hillard PA (editors). *Novak's Gynecology*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1996. pp 1155-1230.
6. Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer*, 1957, 11, 359-377.
7. Codegoni AM, Bertoni F, Colelle G, et al. Microsatellite instability and frameshift mutations in genes involved in cell cycle progression or apoptosis in ovarian cancer. *Oncol Res*, 1999, 11, 297-301.
8. Compton MM. A biochemical hallmark of apoptosis: internucleosomal degradation of the genome. *Cancer Metastasis Rev*, 1992, 11, 105-9.
9. Friess H, Lu Z, Graber HU, et al. Bax but not bcl-2 influences the prognosis of human pancreatic cancer. *Gut*, 1998, 43, 414-21.
10. Gascoyne RD, Krajewska M, Krajewsky S, et al. Prognostic significance of BAX protein expression in diffuse aggressive Non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 1997, 90, 3173-8.
11. Hortobagyi GN. Treatment of breast cancer. *N Engl J Med*, 1998, 339, 974-84.
12. Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 1972, 26, 239-57.
13. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*, 1994, 73, 2013-26.
14. Krajewski S, Krajewska M, Turner BC, et al. Prognostic significance of apoptosis regulators in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 1999, 6, 29-40.
15. Lipponen P. Apoptosis in breast cancer: relationship with other pathological parameters. *Endocr Relat Cancer*, 1999, 6, 13-6.
16. Maciorowski Z, Klijanienko J, Paday E, et al. Differential expression of Bax and Bcl-2 in the assessment of cellular dynamics in fine-needle samples of primary breast carcinoma. *Cytometry*, 2000, 42, 264-9.
17. McGuire W, Clark GM. Prognostic factors and treatment decisions in axillary node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 1992, 326, 1756-61.
18. Mendez O, Manas S, Peinado, et al. Microsatellite instability is associated with the loss of apoptosis in ductal breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat*, 2001, 65, 171-7.
19. Miyashita T, Reed JC. Tumor suppressor p53 is a direct transcriptional activator of the human bax gene. *Cell*, 1995, 80, 293-9.
20. Morsi HM, Leers MP, Radespiel-Troger M et al. W. Apoptosis bcl-2 expression and proliferation in benign and malignant endometrial epithelium: An approach using multiparameter flow cytometry. *Gynecol Oncol*, 2000, 77, 11-7.
21. Ouyang H, Furukawa T, Abe T, et al. The BAX gene, the promoter of apoptosis, is mutated in genetically unstable cancers of the colorectum, stomach and endometrium. *Clin Cancer Res*, 1998, 4, 1071-4.



22. Reed JC, Miyashita T, Takayama S, et al. *BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy*. J Cell Biochem, 1996, 60, 23-32.
23. Reed JC. *Bcl-2 and the regulation of programmed cell death*. J Cell Biol 1994, 124, 1-6.
24. Scarf R. W, Torloni H. *Histological typing of breast tumors*. Geneva: World Health Organization, pp 13-20.
25. Searle J, Kerr JF, Bishop CJ. *Necrosis and apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance*. Pathol Annu, 1982, 17, 229-59.
26. Shilkaitis A, Graves J, Mehta RP, et al. *Bcl-2 and Bax are differentially expressed in hyperplastic, pre-malignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis*. Cell Growth Differ, 2000, 11, 437-45.
27. Shilkaitis A, Graves J, Mehta RR, et al. *BCL-2 and BAX are differentially expressed in hyperplastic, pre-malignant, and malignant lesions of mammary carcinogenesis*. Cell Growth Differ, 2000, 11, 437-45.
28. Song Q, Kuang Y, Divit VM, Vincenz C. *BOO, a novel negative regulator of cell death, interacts with Apaf-1*. EMBO J, 1999, 18, 167-78.
29. Sturm I, Papadopoulos S, Hillebrand T, et al. *Impaired BAX protein expression in breast cancer: mutational analysis of the BAX and the p53 gene*. Int J Cancer, 2000, 87, 517-21.
30. Tai YT, Lee S, Niloff E, et al. *BAX protein expression and clinical outcome in epithelial ovarian cancer*. J Clin Oncol, 1998, 16, 2583-90.
31. Vakkala M, Lahtenmaki K, Raunio H, et al. *Apoptosis during breast carcinoma progression*. Clin Cancer Res, 1999, 5, 319-24.
32. Villa R, Folini M, Perego P, et al. *Telomerase activity and telomere length in human ovarian cancer and melanoma cell lines: correlation with sensitivity to DNA damaging*. Int J Oncol, 2000, 16, 995-1002.
33. Wagener C, Bargou RC, Daniel PT, et al. *Induction of the death-promoting gene bax-alpha sensitizes cultured breast cancer cells to drug-induced apoptosis*. Int J Cancer, 1996, 67, 138-41.
34. Wyllie AH. *Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview*. Cancer and Metastasis Reviews, 1992, 11, 95-103.
35. Yin C, Knudson CM, Korsmeyer SJ, Van DT. *Bax suppresses tumorigenesis and stimulates in vivo*. Nature, 1997, 385, 637-40.
36. Zhang CJ, Kimijima I, Watanabe T, et al. *Correlation between apoptotic index, bcl-2 protein expression and progression and prognosis in breast carcinoma*. Gan To Kagaku Rycho, 1998, 25, 415-21.

Adres do korespondencji

Pracownia Biologii Molekularnej
Zakład Patomorfologii Klinicznej
Instytut Centrum Zdrowia Matki Polki
ul. Rzgowska 281/289
93-338 Łódź
tel. +48 0 (prefiks) 42 271 12 80,
faks +48 0 (prefiks) 42 271 14 21

