

TNF jest plejotropową cytokiną o charakterze prozapalnym. Oddziałuje na szereg komórek układu immunologicznego, wpływa na produkcję i wydzielanie innych cytokin, działa cytostycznie w stosunku do wielu linii nowotworowych. Stosunkowo mało wiadomo natomiast na temat roli TNF w procesie angiogenezy. Doniesienia nie są jednoznaczne i wydaje się, iż w zależności od warunków może on wpływać hamująco lub stymulująco na tworzenie nowych naczyń. Działanie stymulujące polega przede wszystkim na aktywacji genów kodujących czynniki proangiogenne, takie jak VEGF, FGF, IL-8 oraz ich receptory, podczas gdy działanie hamujące objawia się poprzez wygaszanie kaskad sygnalizacyjnych ww. receptorów oraz aktywacją inhibitorów angiogenezy. Wyniki badań, zarówno w układach *in vitro*, jak i *in vivo* sugerują, że zmiennymi warunkującymi efekt modulujący angiogenezę są: stężenie cytokiny oraz czas ekspozycji na jej działanie.

Słowa kluczowe: TNF, angiogeneza, naczynia krwionośne, nowotwór.

Rola czynnika martwicy nowotworu (TNF) w procesie angiogenezy

The role of tumor necrosis factor (TNF) in angiogenesis

Marcin Okrój, Jacek Bigda

Katedra Histologii i Immunologii, Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG-AMG, Akademia Medyczna w Gdańsku

Jednym z krytycznych czynników w rozwoju guzów litych jest ich zaopatrzenie w składniki odżywcze, wymiana gazowa i odprowadzanie metabolitów, odbywające się za pośrednictwem naczyń krwionośnych. Możliwość wzrostu guza są limitowane przez unaczynienie tkanki, a dalsze stadia jego rozwoju zależą od wytworzenia sieci nowych naczyń krwionośnych. Powszechnie uważa się, że bez procesu neowaskularyzacji guzy lite nie są w stanie przekroczyć rozmiarów 2–3 mm³ [1]. O tym, jak ważnym zjawiskiem dla wzrostu komórek nowotworowych jest angiogeneza przekonują doświadczenia Li i wsp. [2]. Zwierzętom doświadczalnym usunięto fragment skóry, pozostawiając tkankę łączną z naczyniami krwionośnymi, ubytek pokryto szklanym okienkiem i do tak przygotowanego miejsca podano 20–50 komórek nowotworowych ekspresujących zielone białko fluorescencyjne (GFP). Przez następne dni obserwowano losy znakowanych komórek. Już drugiego dnia wyodrębniła się populacja komórek o morfologii fibroblastów, która w ciągu dwóch następnych dni migrowała w kierunku istniejących naczyń i ulegała proliferacji. Pozostałe wszczepione komórki nowotworowe zanikły. W tym czasie zauważalne były zmiany w architekturze naczyń sąsiadujących z grupą komórek nowotworowych, a w 8. dniu eksperymentu, gdy populacja osiągnęła liczbę 300–400 komórek powstały nowe, funkcjonalne naczynia krwionośne. Kiedy w tym samym układzie doświadczalnym razem z komórkami guza podano rozpuszczalną formę receptora dla naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu (receptora VEGF) – inhibitora substancji znanej jako jeden z silniejszych czynników proangiogennych, populacja komórek nowotworowych znikła w ciągu 5 dni od implantacji. Wyniki te wskazały, że zmiany zachodzące lokalnie w układzie naczyniowym pod wpływem komórek nowotworowych zaczynają się już na bardzo wczesnym etapie wzrostu guza i są

one bezwzględnie konieczne dla dalszego rozwoju nowotworu. Również bardzo wczesnie dochodzi do lokalnego wydzielania czynników angiogennych, a ograniczenie ich aktywności ma wpływ na proliferację i przeżywalność komórek nowotworowych *in vivo*. Dlatego komórki nowotworowe wytworzyły szereg mechanizmów, które w sposób bezpośredni lub pośredni stymulują angiogenezę w swoim sąsiedztwie. Wydzielają one cytokiny, które parakrynnie stymulują komórki śródbłonka do proliferacji i przestrzennej organizacji w nowe naczynia. Komórki nowotworowe zdolne są do indukcji stanu zapalnego, pod wpływem tego mediatorów substancje proangiogenne produkowane są przez makrofagi, neutrofile, limfocyty, fibroblasty oraz komórki śródbłonka. Przykładowo wykazano, że interleukina 1 (IL-1) produkowana przez jednojądrzaste komórki krwi obwodowej [3] oraz płytki krwi [4] wzmacnia sekrecję interleukiny 8 przez komórki śródbłonka i fibroblasty. Ponadto pod wpływem IL-1 wzrasta ekspresja molekuł adhezyjnych na powierzchni śródbłonka (VCAM-1, selektyna E) [5] i na komórkach nowotworowych (ICAM-1) [6], wzrasta też aktywność metaloproteinaz [7], które degradują *matrix* zewnątrzkomórkowe i mogą uwalniać zdeponowane tam czynniki wzrostowe [8]. Powyższe zjawiska mają niewątpliwie swoje implikacje w bardzo wczesnych etapach kolonizacji tkanek przez nowotwór.

Do najlepiej scharakteryzowanych i najsilniej działających substancji stymulujących angiogenezę należą wspomniane wcześniej interleukina 8 (IL-8) i naczyniowo-śródbłonkowy czynnik wzrostu (VEGF) oraz czynniki wzrostu fibroblastów (FGF). Wydzielanie tych cytokin, ich szlaki sygnalizacji, a także proces rearanżacji przestrzennej komórek śródbłonka, prowadzący ostatecznie do wytworzenia nowej sieci kapilar, podlegają regulacji przez cytokiny, m.in. czynnik martwicy nowotworu (TNF) i interferon- γ (IFN- γ). W układach *in vitro* wykazano anty-

TNF is a pleiotropic, proinflammatory cytokine produced by activated monocytes and macrophages. Its action is mediated by the cell-surface receptor, of which two species have been identified as TNF- R1 or p55 (of molecular weight 55 kDa) and TNF- R2 or p75 (of molecular weight 75 kDa). TNF influences function of immunocompetent cells, production and secretion of other cytokines and induces cytotoxic effect towards different tumor cells. Since it is well known that angiogenesis is the limiting factor of tumor progression and it can be regulated by various cytokines, knowledge on the way particular cytokines modulate angiogenesis can be useful for design of antitumor therapies. TNF is a ligand that can initiate many signaling pathways resulting in production of factors influencing angiogenesis. TNF can also directly affect function of endothelial cells. Reports on the role of TNF in angiogenesis are equivocal and indicate that TNF seems to function as stimulatory or inhibitory agent depending on the conditions applied in an experiment. Stimulatory action stems from activation of genes coding for proangiogenic factors (e.g. VEGF, FGF, IL-8) and its receptors. Activation of proangiogenic substances is mediated by transcription factors: NFκB, sp-1, c-Jun. TNF-mediated inhibition of angiogenesis results from down-regulation of receptors for proangiogenic factors (IL8-R, flt-1, flk-1, flg) and activation of angiogenesis inhibitors such as angiopoietin-2. Moreover, TNF can influence angiogenesis indirectly by stimulation of other cells, especially macrophages and modulation of adhesion molecules expressed on endothelial cells. Since the high expression of particular integrins on these cells and higher amount of fibronectin in tumor vasculature substratum was found, adhesion is believed to be a very important event in angiogenesis. The results of in vitro and in vivo research suggest two critical variables responsible for TNF effect on angiogenesis: concentration of cytokine and time of exposure of target cells to the cytokine. Low doses of TNF and short time of exposure result in proangiogenic effect, while high doses and longer exposure can act as antiangiogenic conditions.

Key words: TNF, angiogenesis, blood vessels, tumor.

giogeny charakter IFN- γ , objawiający się zahamowaniem wzrostu i migracji komórek śródbłonkowych [9], obniżeniem poziomu integrzyn na ich powierzchni [10] czy działaniem antagonistycznym w stosunku do czynników wzrostu [11]. Czynniki martwicy nowotworu może wykazywać zarówno działanie stymulujące, jak i hamujące angiogenezę. Efekt TNF jest bowiem najprawdopodobniej zależny od czasu ekspozycji komórek oraz od miejscowego stężenia.

Pracą, w której wszechstronnie opisano stymulujące działanie TNF wobec angiogenezy, a także mechanizm działania tej cytokiny jest publikacja Yoshida i wsp. [12]. W opisanych w niej doświadczeniach efekt biologiczny oceniano po krótkiej, 15-minutowej stymulacji TNF o stężeniu 100 U/ml. Komórki śródbłonka poddane działaniu TNF wykazywały wyraźny wzrost poziomu mRNA dla IL-8, VEGF i bFGF, a także mRNA receptorów dla tych cytokin (IL-8R, flt-1, flk-1, flg). Komórki po stymulacji TNF w trójwymiarowym żelu kolagenowym tworzyły struktury ruropodobne (ang. *tube-like structures*), co jest zjawiskiem analogicznym do formowania naczyń *in vivo*. Intensywność tego zjawiska zbadano dodatkowo w zależności od zastosowanej dawki TNF. Łączna długość struktur ruropodobnych osiągała maksymalne wartości przy stężeniu 100 U/ml TNF, a obniżała się przy wyższych stężeniach cytokiny. Znaczne obniżenie ich długości obserwowano również, kiedy do żelu kolagenowego podano przeciwciała przeciw IL-8, VHGF i bFGF, co pośrednio dowodziło, że wzmożona angiogeneza indukowana podaniem TNF zależna jest od wydzielania tych właśnie substancji. Próbuąc zgłębić mechanizm zjawiska, do stymulowanych komórek autorzy podali antysensowne oligonukleotydy o sekwencji czynników transkrypcyjnych. Oligonukleotydy powodowały spadek długości struktur ruropodobnych. Silny efekt wywarły oligonukleotydy komplementarne do mRNA kodującego Sp1, NFκB, nieco słabsze było zahamowanie wywołane podaniem oligonukleotydu komplementarnego do mRNA c-Jun. Świadczy to o udziale wspomnianych czynników transkrypcyjnych w procesie angiogenezy indukowanej TNF. W dalszym etapie sprawdzono, które czynniki transkrypcyjne odpowiadają za ekspresję poszczególnych substancji proangiogenychnych. Posłużono się również antysensownymi oligonukleotydami, które zostały podane do hodowli komórek śródbłonkowych stymulowanej przez TNF *in vitro*, a następnie, przy pomocy testu ELISA, oceniano wydzielanie poszczególnych substancji angiogenychnych w supernatantach. Ekspresja IL-8 okazała się być zależna przede wszystkim od aktywności czynnika transkrypcyjnego NFκB, natomiast ekspresja VEGF była zależna zarówno od aktywacji czynnika NFκB, jak i Sp1. Z kolei wydzielanie bFGF było hamowane w niewielkim stopniu przez oligonukleotyd antysensowny dla c-Jun, co wskazywało na udział czynnika transkrypcyjnego

AP-1 w aktywacji wydzielania tego czynnika angiogenego. Proangiogenne działanie TNF może wynikać nie tylko ze stymulacji wydzielania cytokin proangiogenychnych, lecz również może być wynikiem pobudzenia syntezy endogennego tlenu azotu w komórkach śródbłonkowych, co prowadzi do ich migracji i powstawania nowych naczyń [13].

Innym modelem doświadczalnym *in vitro*, na którym wykazano proangiogenne działanie TNF jest linia glejaka U251 [14]. Komórki te zdolne są do spontanicznego wydzielania VEGF. W opisanych doświadczeniach stosowano dawkę TNF 100 U/ml i analizowano jej wpływ na poziom mRNA dla VEGF w zależności od czasu stymulacji. Ponad trzykrotny wzrost VEGF mRNA obserwowano przy krótkich czasach stymulacji komórek TNF (od 30 min), natomiast począwszy od inkubacji 3-godzinnej ilość mRNA gwałtownie spadała. Warto nadmienić, że poziom mRNA dla czynnika transkrypcyjnego Sp1 po 30 min podniósł się 7-krotnie, a po godz. zaczął gwałtownie spadać. Podobna kinetyka świadczy o korelacji ekspresji czynnika transkrypcyjnego Sp1 z ekspresją VEGF. Podanie mitramycyny (związek wiążący się do sekwencji GC i uniemożliwiający przyłączenie Sp1 do sekwencji promotorowych niektórych genów) spowodowało zależny od dawki spadek ilości VEGF mRNA po stymulacji TNF. Wyniki te potwierdziły, że stosunkowo niskie dawki TNF mogą zwiększać ekspresję substancji proangiogenychnych przy krótkich czasach stymulacji.

Doświadczenia *in vitro* na komórkach śródbłonkowych, w których stosowano dłuższe czasy stymulacji TNF wskazały na antyangiogeny charakter tej cytokiny. Patterson i wsp. [15] wykazali, że traktowanie komórek śródbłonkowych VEGF przez 24 godz. zwiększa ponaddwukrotnie aktywność proliferacyjną mierzoną testem inkorporacji timidyny. Dwonastogodzinna preinkubacja z TNF całkowicie zniósła ten efekt, natomiast sam TNF wykazywał jedynie słabo wyrażony efekt cytotoksyczny wobec komórek śródbłonka. W dalszej części pracy autorzy wykazali, że zahamowanie proliferacji komórek śródbłonka przez TNF było związane z obniżeniem poziomu transkrypcji RNA receptorów dla VEGF: flk-1 i flt-1. Obniżeniu poziomu mRNA dla receptorów towarzyszyło obniżenie ekspresji specyficznych produktów białkowych. Dodatkowe eksperymenty wyjaśniły, że opisywane wyniki nie zależały od obniżenia czasu półtrwania mRNA dla receptorów, ale bezpośrednio od natężenia transkrypcji. Ponadto, wywołane przez TNF osłabienie tempa transkrypcji genów kodujących receptory flk-1 i flt-1 było zależne od syntezy białek. Modulacyjne działanie TNF wobec traktowanych VEGF komórek śródbłonka mogło być zniesione przez estry forbolu, natomiast bez wpływu pozostawały deksametazon, indometacyna, transformujący czynnik wzrostu β (TGF- β), pochodne cyklicznego AMP i antyoksydant PDTTC.

Mechanizm antyangiogenego działania TNF może również polegać nie tylko na obniżeniu ekspresji VEGF bądź jego receptorów, lecz również na zahamowaniu sygnalizacji receptora VEGF receptora flk-1. VEGF łącząc się z receptorem flk-1 (KDR) powoduje fosforylację tyrozyny w jego domenie wewnątrzkomórkowej, a zainicjowana w ten sposób kaskada prowadzi do aktywacji MAP-kinaz i ostatecznie do replikacji DNA w komórkach śródbłonka. Guo i wsp. [16] udowodnili, że 3-godzinna inkubacja komórek HUVEC z TNF po ich wcześniejszej stymulacji VEGF powoduje obniżenie ilości fosfotyrozyny na receptorze flk-1. W tych warunkach z receptorem asocjowała fosfataza tyrozynowa SHP-1 hamująca proces sygnalizacji VEGF.

Podobne właściwości TNF, tzn. obniżenie aktywności proliferacyjnej stymulowanych komórek śródbłonkowych *in vitro* obserwowano w przypadku ich stymulacji innymi proangiogenymi czynnikami wzrostowymi aFGF i bFGF [17].

Innym antyangiogenym skutkiem podania TNF jest wzrost ekspresji angiopoetyny 2 obserwowany w komórkach HUVEC. Angiopoetyna 1 (Ang-1) i angiopoetyna 2 (Ang-2) są ligandami dla receptorowej kinazy tyrozynowej Tie-2, występującej na błonie komórek śródbłonkowych. Obie substancje wykazują 60-procentową homologię w sekwencji aminokwasowej. Angiopoetyna 1 po związaniu z receptorem prowadzi do wzrostu unaczynienia nowotworów, natomiast angiopoetyna 2 jest kompetencyjnym antagonistą Ang-1. Po związaniu z receptorem zapobiega jego autofosforylacji, a ostatecznym efektem jej działania jest zahamowanie tworzenia nowych naczyń [18]. Komórki HUVEC wykazywały wzrost ekspresji mRNA dla Ang-2 już po 2-godzinnej stymulacji TNF, a do najsilniejszej ekspresji dochodziło po 6-godzinnej stymulacji. W tych warunkach stwierdzono również wzrost poziomu mRNA dla Ang-2 proporcjonalnie zależny od dawki TNF.

Efekt TNF na angiogenezę w zależności od dawki w warunkach *in vivo* zbadali Fajardo i wsp. [19]. W tych doświadczeniach implanty zawierające różne stężenia cytokiny były wszczepiane podskórnie myszom, a po określonym czasie badano stan lokalnego mikrounaczynienia. W modelu tym niskie dawki TNF (rzędu 0,01–1 ng) stymulowały neowaskularyzację, a dawki wysokie (ponad 1 µg) wywierały przeciwny efekt. Wcześniej proangiogeny efekt niskich dawek TNF *in vivo* zaobserwował Leibovich i wsp. [20]. Teflonowe implanty nasączone 3,5 ng TNF, wszczepione do rogówki szczura powodowały po 7 dniach zauważalny wzrost naczyń krwionośnych. Podobny efekt uzyskano, gdy implant nasączono pożywką pochodzącą z hodowli *in vitro* makroforagów otrzewnowych stymulowanych tioglikolanem, natomiast ta sama pożywka potraktowana przeciwciałem neutralizującym TNF nie wykazywała właściwości proangiogenych. Podobne wyniki autorzy uzyskali również na innym modelu *in vivo*, tj. na błonach podo-

wych zarodka kurzego (CAM). Wyniki były podobne, angiogeny wpływ TNF zauważalny był już przy dawce 1 ng, a stężenia najbardziej efektywne mieściły się w zakresie 5–50 ng. Przytoczona wcześniej praca Frater-Schroder i wsp. [17] opisywała cytostaticzny efekt TNF wobec bydlęcych komórek śródbłonkowych (zarówno pochodzących z naczyń kapilarnych, jak i z aorty) i komórek mięśniówki gładkiej w hodowli *in vitro*. TNF okazał się inhibitorem proliferacji badanych komórek stymulowanych uprzednio aFGF lub bFGF. Po usunięciu TNF z pożywki po kilku dniach komórki wznowiały proliferację. Z kolei w eksperymencie *in vivo*, w którym implanty poliwinylowe nasączone FGF oraz TNF wszczepiono do rogówki królika obserwowano efekt odwrotny. Obie substancje w sposób synergistyczny stymulowały wzrost naczyń w obrębie rogówki.

Proces angiogenezy w warunkach *in vivo* jest niezwykle złożony i zależy od wielu komponentów komórkowych, pozakomórkowych i humoralnych. Wśród komórek wpływających na angiogenezę należy wymienić fibroblasty, limfocyty, komórki mięśniówki gładkiej otaczającej naczynia, a przede wszystkim makrofagi. Uważa się, że makrofagi pełnią kluczową rolę w neowaskularyzacji guza [21]. Są głównym źródłem zarówno cytokin prozapalnych, w tym TNF, jak też niektórych czynników wzrostowych dla komórek śródbłonka [22]. Makrofagi mogą wpływać na wszystkie stadia angiogenezy: zmiany w *matrix* zewnątrzkomórkowej, proliferację komórek śródbłonka, formowanie kapilar [23].

Dużą rolę w procesie angiogenezy odgrywa również zjawisko adhezji komórkowej oraz struktura *matrix* zewnątrzkomórkowej. Naczynia otaczające guz charakteryzuje wysoka ekspresja integryny $\alpha 5\beta 3$ i $\alpha V\beta 1$ na powierzchni komórek śródbłonkowych oraz wysoki poziom fibronektyny w podścielisku [24]. Interakcje pomiędzy tymi komponentami wydają się być ściśle zaangażowane w proces powstawania nowych naczyń. Podanie przeciwciał przeciw fibronektynie lub antagonistów integryny powoduje zahamowanie angiogenezy, natomiast IL-8, bFGF oraz TNF powodują wzrost ekspresji zarówno integryn, jak i fibronektyny *in vivo*.

Paradoksalnie przeciwstawne efekty TNF na proces angiogenezy są zależne od zastosowanej dawki i długości czasu podania cytokiny. Mogą zatem wynikać z odmiennego oddziaływania TNF na komórki wykazujące różny poziom ekspresji receptorów tej cytokiny. Ponadto, w niskich stężeniach TNF może uruchamiać sygnalizację za pośrednictwem zarówno receptora p75, jak i p55. Natomiast w wysokich stężeniach TNF dominuje aktywacja receptora p55 [25]. W zależności od zastosowanego modelu komórkowego ostateczny efekt działania TNF może być zatem odmienny w zależności od ekspresji receptorów i aktywności uruchamianych wskutek ich pobudzenia w badanych komórkach czy tkankach. Dokładne poznanie mechanizmu działania TNF, zarówno na komórki śród-

błonka, jak i inne komórki regulujące proces angiogenezy, może pozwolić na szersze wprowadzenie protokołów terapeutycznych wykorzystujących kombinację tej cytokiny i innych modulatorów angiogenezy [26].

PIŚMIENNICTWO

- Folkman J, Klagsbrun M. Science 1987; 235: 442-7.
- Li CY, Shan S, Huang Q, Braun R D, Lanzen J, Hu K Lin P, Dewhirst M. J Natl Cancer Institute 1999; 92: 143-7.
- Kaplanski G, Farnarier C, Kaplanski S, Porat R, Shapiro L, Bongrand P, Dinarello CA. Blood 1994; 84: 4242-8.
- Kaplanski G, Porat R, Aiura K, Erban JK, Gelfand JA, Dinarello CA. Blood 1993; 81: 2492-5.
- Chirivi RG, Garofalo A, Padura IM, Mantovani A, Giavazzi R. Cancer Res 1993; 53: 505 I-4.
- McKenzie RC, Oran A, Dinarello CA, Sauder DN. Anticancer Res 1996; 16: 437-41.
- Scheller M, Zimmermann R, Bernimoulin JP, Scholz P. Cytokine 1995; 7: 33 1-7.
- Tamura T, Nakanishi T, Kimura Y, Hattori T, Sasaki K, Norimatsu H, Takahashi K, Takigawa M. Endocrinology 1996; 137: 3729-37.
- Maier JA, Morelli D, Lazzarini D, Menard S, Colnaghi MI, Balsari A. Cytokine 1999; 11: 134-9.
- Ruegg C, Yilmaz A, Bieler G, Bamat J, Chaubert P, Lejeune FJ. Nat Med 1998; 4: 408-14.
- Sato N, Nariuchi H, Tsuruoka N, Nishihara T, Beitz JG, Calabresi P, Frackelton AR. J Invest Dermatol 1990; 95 (6 suppl): 85-9.
- S Yoshida, Ono M, Shono T, Izumi H, Ishibashi T, Suzuki H, Kuwano M. Mol Cell Biol 1997; 17: 4015-23.
- Montrucchio G, Lupia E, de Martino A, Battaglia E, Arese M, Tizzani A, Bussolino F, Caamusi G. Am J Pathol 1997; 151: 557-63.
- Ryuto M, Ono M, Izumi R, Yoshida S, Weich HA, Kohno K, Kuwano M. J Biol Chem 1996; 45: 28220-8.
- Patterson C, Perrella MA, Endege WO, Yoshizumi M, Lee MB, Flaber E. J Clin Invest 1996; 98: 490-6.
- Guo D-Q, Wu L-W, Dunbar JD, et al. J Biol Chem 2000; 275: M 216-21.
- Frater-Schroder M, Risau W, Hallmann R, Gautsch P. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84: 5277-81.
- Kim I, Kim JH, Ryu YS, Liu M, Koh GY. Biochem Biophys Res Commun 2000; 269: 361-5.
- Fajardo LF, Kwan HH, Kowalski J, Prionas SD, Allison AC. Am J Pathol 1992; 140: 539-44.
- Leibovich S, Polverini PJ, Shephard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N. Nature 1987; 329: 630-2.
- Toritsu H, Ono M, Kiryu H, et al. Int J Cancer 2000; 85: 182-8.
- Arras M, Ito WD, Scholz D, Winkler B, Schaper J, Schaper W. J Clin Invest 1998; 101: 40-50.
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhargava R, Sorg C. J Leukoc Biol 1994; 55: 410-22.
- Kim S, Bell K, Mousa SA, Varner JA. Am J Pathol 2000; 156: 1345-62.
- MacKay F, Loetscher H, Stueber D, Gehr G and Lesslauer W. J Exp Med 1993; 177: 1277-86.
- Mysłiński A, Bigda J, Koszałka P, Szmít E. Anticancer Res 2000; 20: 4643-7.

ADRES DO KORESPONDENCJI

prof. dr hab. med. **Jacek Bigda**
Katedra Histologii i Immunologii
Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii
UG-AMG
Akademia Medyczna
ul. Dębinki 1
80-211 Gdańsk
tel. (058) 349 14 34
fax (058) 349 14 45
e-mail: jbigdg@anig.gda.pl

Praca została wykonana w ramach projektu KBN nr rej. 6 P04A 01721.