

Jest powszechnie znanym faktem, że w normalnej ludzkiej komórce wraz z wiekiem następuje stała akumulacja uszkodzeń DNA wynikających z ataku wolnych rodników, szczególnie rodnika hydroksylowego ($\cdot\text{OH}$). Organizmy aerobowe wykształciły systemy obrony, polegające na wytworzeniu układów enzymatycznych i antyoksydacyjnych osłaniających komórkę przed toksycznymi formami tlenu. Do mechanizmów obronnych należy również zaliczyć systemy naprawcze, mające na celu oksydacyjne uszkodzenia DNA, polegające na wycinaniu zmodyfikowanych zasad i nukleozydów i wydalaniu ich z organizmu. Jest powszechnie akceptowane, że uszkodzenia DNA, takie jak oksydacyjne zmodyfikowane zasady i nukleotydy są przy sprawnych systemach naprawy wycinane i bez dalszych zmian metabolicznych wydzielane do moczu.

W aktualnym piśmiennictwie panuje zgodność co do zastosowania oznaczeń 8-oksy-2'-deoksyguanozyny (8-oksydG) i 8-oksyguaniny (8-oksyGua) w moczu jako dobrego markera formowania uszkodzeń oksydacyjnych DNA *in vivo*. Obecność zmodyfikowanego nukleotydu guaniny (8-oksydG) w moczu reprezentuje najważniejszą ścieżkę naprawy produktów oksydacyjnych uszkodzeń DNA *in vivo*, naprawę przez wycinanie nukleorydów NER (ang. nucleotide excision repair). Jakkolwiek oksydacyjne uszkodzenia zasad DNA głównie są naprawiane przez wycięcie zasad BER (ang. base excision repair). Analiza w moczu 8-oksyGua przedstawia szczególne trudności, i aż do niedawna stosowane metody nie były wiarygodne. Ostatnio rozwinięto nową technikę jednoczesnej ilościowej analizy w tej samej próbce moczu zmo-

Biomarkery reperacji DNA w moczu

Biomarkers of oxidative DNA damage repair in urine

Krzysztof Roszkowski

Katedra Biochemii Klinicznej, Akademia Medyczna w Bydgoszczy

WPROWADZENIE

Procesy, w wyniku których dochodzi do uszkodzeń DNA, sposoby jego naprawy i konsekwencje wynikające z zaburzeń w naprawie dotyczą całego świata ożywionego. Chociaż istnieją różnice w budowie i organizacji DNA, w budowie i specyficzności działania systemów naprawczych, ich schemat działania w bakteryjnych organizmach jednokomórkowych, komórkach diploidalnych roślin czy w tkankach ludzkich, jest podobny [1]. Walka o zachowanie i utrzymanie integralności genomu trwa nieustannie.

Mutacje nie tylko powodują destrukcję genomu, często były też motorem ewolucji, ułatwiając organizmom przeżycie w zmieniających się warunkach.

Jest powszechnie akceptowane, że uszkodzenia DNA, takie jak oksydacyjnie zmodyfikowane zasady i nukleotydy są przy sprawnych systemach naprawy wycinane i bez dalszych zmian metabolicznych wydzielane do moczu [2, 3, 4, 5]. Wśród wielu możliwych produktów reperacji w moczu zostały zidentyfikowane: 8-oksy-2'-deoksyguanozyna (8-oksydG), 8-oksyguanina (8-oksyGua), glikol tyminy (Tg), glikol tymidyny (dTg), 5-hydroksymetyloracyl (5-OHMu), 5-hydroksyuracyl (5-OHu) i 8-oksyadenina (8-oksyAde) [6, 7, 8, 9, 10, 11].

W aktualnym piśmiennictwie panuje zgodność co do zastosowania oznaczeń 8-oksydG i 8-oksyGua w moczu jako dobrego markera formowania uszkodzeń oksydacyjnych DNA *in vivo*. Uważa się, że poziom 8-oksy-2'-deoksyguanozyny w moczu jest zdeterminowany naprawą DNA *in vivo* przez wycinanie nukleotydu (NER) [4, 12]. Drugą możliwością pojawiania się 8-oksydG jest usuwanie oksydacyjnie zmodyfikowanych nukleotydu z ich puli komórkowej. 8-oksy-dGTP jest rozkładane przez 8-oksy-dGTPazę do 8-oksy-dGMP, po czym następuje defosforylacja przy udziale kinazy guanylowej do 8-oksydG i w takiej postaci jest wydzielana do moczu [13]. Przypuszcza się także, że do usunięcia oksydacyjnie zmodyfikowanego nukleotydu guaniny zdolna jest niespecyficzna endonukleaza, która wycina go w postaci 3',5',8-oksy-dGDP, a dalej podobnie jak w przypadku nukleotydu następuje hydroliza do 8-oksydG [13, 14].

Stężenie 8-oksydG w moczu zostało zaproponowane jako nieinwazyjny biomarker uszkodzeń oksydacyjnych DNA *in vivo* [4]. Loft podaje, że wydalanie 8-oksydG przez człowieka zdrowego wynosi 200-600 pmol/kg/24 godz., co odpowiada 168-504 oksydacyjnym modyfikacjom guaniny na dzień dla każdej z 5×10^{13} komórki organizmu [4].

dyfikowanego nukleotydu 8-oksydG i zasady 8-oksygua z wykorzystaniem wysoko-sprawnej chromatografii cieczowej HPLC i chromatografii gazowej ze spektrometrią masową (GC/MS).

W pracy przedstawiono aktualne wyniki prac badawczych, oceniających wpływ niektórych czynników, takich jak wiek, metabolizm i wysiłek fizyczny, palenie tytoniu, wpływ diety i choroby nowotworowej na poziom w moczu najlepiej poznanych biomarkerów naprawy uszkodzeń oksydacyjnych DNA człowieka 8-oksy-2-deoksyguanozyny i 8-oksyguaniny.

Słowa kluczowe: biomarkery w moczu, naprawa DNA, 8-oksy-2-deoksyguanozyna, 8-oksyguanina.

Nie można wykluczyć, że 8-oksydG pojawia się w moczu w wyniku degradacji DNA, pochodzącego z martwych komórek, powstałych w wyniku apoptozy czy nekrozy.

Techniką HPLC analizowano również zawartość 8-oksyguaniny (8-oksygua) w moczu. Stwierdzono, że stężenie tej cząsteczki w moczu jest podobne do zawartości 8-oksydG [7]. Opisano kilka glikozylaz, które w sposób szczególny rozpoznają i usuwają 8-oksygua z komórek człowieka [15, 16].

Metoda, która byłaby w stanie określić ilość 8-oksydG i 8-oksygua w tej samej próbce moczu byłaby szczególnie przydatna do poznawania mechanizmów reparacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA u człowieka.

Zbadano wpływ różnych czynników, jak wiek, wysiłek fizyczny, palenie tytoniu, płeć, choroby nowotworowe na wydalanie 8-oksydG.

WIEK

Porównawcza analiza zawartości 8-oksydG w moczu ludzi zdrowych z kilku badań wskazuje, że poziom zmodyfikowanego nukleotydu może spadać wraz z wiekiem [12]. Można to tłumaczyć spowolnionym metabolizmem u osób starszych, jak również niewydolnością mechanizmów naprawy [4].

W aktualnym piśmiennictwie brakuje badań, które stwierdzałyby zależność poziomu 8-oksygua w moczu człowieka od wieku.

METABOLIZM I WYSIŁEK FIZYCZNY

Zależność między tempem metabolizmu a wydalaniem 8-oksydG została wykazana przez kilku badaczy [3, 17, 18]. Z przeprowadzonych badań wynika, że osoby otyłe wydalają mniej 8-oksydG niż osoby szczupłe. Mężczyźni wydalają ok. 30 proc. więcej 8-oksydG niż kobiety [19].

Ze względu na przyspieszony metabolizm tlenu, wysiłek fizyczny powinien generować oksyda-

cyjne uszkodzenia DNA. Jednak krótkoterminowy wysiłek nie powodował znaczącego wzrostu w moczu 8-oksydG, natomiast 10 godz. po intensywnym wysiłku w warunkach maratonu stwierdzano wzrost w moczu 8-oksydG do 130 proc. stanu wyjściowego w przeliczeniu do poziomu kreatyniny w moczu [20]. Ponadto po okresie 30-dniowych intensywnych ćwiczeń od 8 do 11 godz. dziennie u żołnierzy, poziom 8-oksydG powiększał się znacząco [21].

TYTOŃ

Wpływ palenia tytoniu na podwyższenie zawartości w moczu oksydacyjnie zmodyfikowanego nukleotydu guaniny jest ewidentnie wykazany w licznych doświadczeniach. Stwierdzono, że palacze wydają dziennie ok. 30 do 50 proc. więcej 8-oksydG [19, 22, 23] i ok. 100 proc. więcej 8-oksygua niż niepalący [7]. Ponadto 4 tyg. po zaprzestaniu palenia, wydalanie 8-oksydG zmniejszało się o 20 proc. u 65 osób poddanych kontrolowanemu badaniu [24].

WPŁYW DIETY

Przeprowadzono badanie, w którym monitorowano poziom tej pochodnej w moczu szczurów podzielonych na 2 grupy. Jedna była karmiona normalnie, a u drugiej zastosowano dietę nie zawierającą kwasów nukleinowych. Okazało się, że poziom zmodyfikowanej zasady 8-oksygua w moczu szczurów karmionych normalną dietą był o wiele wyższy w porównaniu z wartościami w drugiej grupie. Poziom zmodyfikowanego nukleotydu 8-oksydG w tym przypadku był porównywalny w obu grupach [25].

Inni autorzy po podaniu szczurom dojelitowo znakowanej 8-oksydG oraz dożylnie dG nie stwierdzili w moczu znakowanej 8-oksydG, co sugeruje, że na jej poziom nie wpływa 8-oksydG pochodząca z pokarmu ani oksydacja dG podczas jej

In a normal human cell there is a steady accumulation of DNA lesions with time. Substantial parts of these lesions are due to endogenous factors that damage DNA.

It has been shown that free radicals, attack upon DNA generates a whole series of DNA damage, among them modified bases. Hydroxyl radical ($\cdot\text{OH}$) attack on DNA leads to a large number of pyrimidine- and purine-derived base damage. Some of these modified DNA bases have considerable potential to damage the integrity of the genome.

It is generally accepted that the products of repair of 8-oxoGua in cellular DNA are excreted into the urine without further metabolism.

There is a common belief that the presence of the modified nucleoside (8-oxodGuo) in urine represents the primary repair product of the oxidative DNA damage in vivo, presumably nucleotide excision repair (NER). However, oxidatively damaged DNA bases are mostly repaired by the base excision repair pathway (BER) although the nucleotide excision repair pathway may also play a role in the repair of some oxidised bases in DNA.

Therefore, the assays, which are able to determine the level of 8-oxodGuo as well as the amount of 8-oxoGua in urine, may better reflect oxidative damage of cellular DNA.

The analysis of 8-oxoGua in urine presents particular difficulties and until recently there has been no reliably assay for its detection. Recently a new technique was developed which allowed for simultaneous determination of 8-oxodGuo and 8-oxoGua in the same urine sample. This method involved a HPLC prepurification followed by gas chromatography with isotope di-

wydziałania do moczu [10]. Analiza w moczu 8-oksyoGua przedstawiała jak dotychczas szczególne trudności metodyczne [4, 26] i aż do niedawna metody prezentowane przez autorów nie były godne zaufania.

Ostatnio opracowano metodę pozwalającą na oznaczenie w tej samej próbce moczu produktów reparacji DNA 8-oksyoG i 8-oksyoGua przy wykorzystaniu jednocześnie techniki HPLC i GC/MS [27].

W Katedrze i Zakładzie Biochemii Klinicznej Akademii Medycznej w Bydgoszczy przystosowano do wymogów odczynnikowych i sprzętowych metodę opracowaną przez Ravanata i wsp. Wykorzystując tę technikę przeprowadzono badania mające na celu ocenę wpływu diety na poziomy 8-oksyo-dG i 8-oksyo-Gua w moczu człowieka. Dla oceny dokładności pomiarów 8-oksyo-dG i 8-oksyo-Gua w dobowej zbiorce moczu (DZM), analizy były powtarzane 7 razy w tych samych próbkach moczu dla każdego z badanych. Ponieważ poprzednie badania [28] sugerowały, że ilość 8-oksyoG w moczu szczura osiąga najniższą wartość w drugim lub trzecim dniu diety wolnej od kwasów nukleinowych, próbki moczu (dobowa zbiórka moczu) w tym badaniu zbierane były po trzech dniach stosowania diety wolnej od kwasów nukleinowych i od tych samych osób w trzy do pięciu dni po powrocie do normalnej nieograniczonej diety. Średnie poziomy 8-oksyo-dG i 8-oksyo-Gua analizowanych zestawień obu próbek moczu były porównywalne. Postawiono wniosek, że dobową ilość 8-oksyo-dG i 8-oksyo-Gua wydalana z moczem u człowieka nie zależy od diety i może być kompletnym obrazem ilości tych oksydacyjnych pochodnych zasad azotowych pochodzących z komórkowego DNA [29].

CHOROBY NOWOTWOROWE

Porównywano zawartość 8-oksyoG w moczu pacjentów chorych na chorobę nowotworową z zawartością tego związku w moczu ludzi zdrowych. Wyniki tych badań pokazuje tab.

Produkty naprawy uszkodzeń materiału genetycznego wydzielane są z moczem [17, 27, 35]. Przydatnym w odpowiedzi na wiele pytań o udziale oksydacyjnych zmian w DNA człowieka, w procesie powstawania nowotworów i zaburzeniach mechanizmów naprawy uszkodzonego DNA, mogłaby być metoda umożliwiająca pomiar ilości utlenionych zasad w DNA w materiale pobieranym w sposób nieinwazyjny. Materiałem klinicznym, który pobiera się od pacjentów w sposób nieinwazyjny jest mocz.

Poziom 8-oksyo-dG i 8-oksyo-Gua w moczu człowieka powinien odzwierciedlać z jednej strony poziom uszkodzeń oksydacyjnych w DNA i puli nukleotydowej komórek, a z drugiej sprawność mechanizmów naprawy DNA. Jednak prawdziwe relacje oraz różnorodność międzyosobnicza nie są jeszcze przebadane, ponieważ do niedawna nie istniała metoda jednoczesnego oznaczania tych związków w moczu.

Otwierająca się możliwość szacowania sprawności mechanizmów naprawczych w oparciu o analizę moczu jest niesłychanie pociągająca ze względu na całkowitą bezinwazyjność i może umożliwić opracowanie testów służących do indywidualizacji terapii.

PIŚMIENNICTWO

1. Janion C. *Mutageneza – uszkodzenia i naprawa DNA*. Kosmos 1999; 48 (4): 289-92.
2. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. *Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage*. Proc Natl Acad Sci USA 1992; 86: 9697-701.
3. Loft S, Poulsen HE. *Markers of oxidative damage to DNA: antioxidants and molecular damage*. Methods in Enzymology 1995; 300: 166-84.
4. Loft S, Poulsen HE. *Estimation of oxidative DNA damage in man from urinary excretion of repair products*. Acta Biochem Pol 1998; 45: 133-44.

lution mass spectrometric detection.

Since the level of the modified nucleoside/base in urine may be a good indicator of oxidative DNA insult, and as a general index of oxidative stress.

This review article presents data, which suggest some relationship between the level of 8-oxo-Gua and 8-oxodGuo in human urine and: age, note of metabolism, extent of physical exercise, smoking of tobacco, of diet and development of cancer.

Key words: biomarkers in urine, DNA repair, 8-oxo-2'-deoxyguanosine, 8-oxoguanine.

5. Ravanat JL, Guichert P, Tuce Z, Cadet J. *Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine.* Chem Res Toxicol 1999; 12: 802-8.
6. Loft S, Poulsen HE. *Cancer risk and oxidative DNA damage in man* [published erratum appears in J Mol Med 1997 Jan; 75 (1): 67-8]. J Mol Med 1996; 74: 297-312.
7. Suzuki J, Inoue Y, Suzuki S. *Changes in urinary excretion level of 8-hydroxyguanine by exposure to reactive oxygen-generating substances.* Free Radicals Biol Med 1995; 18: 431-6.
8. Teixeira AJ, Ferreira MR, van Dijk WJ, van de Werken G, de Jong AP. *Analysis of 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in rat urine and liver DNA by stable isotope dilution gas chromatography/mass spectrometry.* Anal Biochem 1995; 226: 307-19.
9. Faure H, Incardona MF, Boujet C, Cadet J, Ducros V, Favier A. *Gas chromatographic-mass spectrometric determination of 5-hydroxymethyluracil in human urine by stable isotope dilution.* J Chromatogr 1993; 616: 1-7.
10. Shigenaga MK, Gimeno CJ, Ames BN. *Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine as a biological marker of in vivo oxidative DNA damage.* Proc Natl Acad Sci USA 1992; 86: 9697-701.
11. Cathcart R, Schwieters E, Saul RL, Ames BN. *Thymine glycol and thymidine glycol in human and rat urine. A possible assay for oxidative DNA damage.* Proc Natl Acad Sci USA 1984; 81: 5633-7.
12. Lunec J, Herbert K, Blount S, Griffiths HR, Emery P. *8-Hydroxydeoxyguanosine. A marker of oxidative DNA damage in systemic lupus erythematosus.* FEBS. Lett. 1994; 348: 131-8.
13. Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. *Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine – Source, Significance and Supplements.* Free Rad Res 2000; 32: 381-97.
14. Tudek B. *Mechanizmy naprawy utlenionych zasad DNA.* Kosmos 1999; 245: 339-52.
15. Radicella JP, Dherin C, Desmaze CH, Fox MS, Boiteux S. *Cloning and characterization of hOGG1, a human homolog of the OGG1 gene of Saccharomyces cerevisiae.* Proc Natl Acad Sci USA 1997; 94: 8010-15.
16. Hazra TK, Izumi T, Maiti L, Floyd RA, Mital S. *The presence of two distinct 8-oxoguanine repair enzymes in human cells: their potential complementary roles in preventing mutations.* Nucleic Acid Res 1998; 26: 5116-22.
17. Loft S, Fischer-Nielsen A, Jeding IB, Vistisen K, Poulsen HE. *8-Hydroxydeoxyguanosine as a biomarker of oxidative DNA damage.* J Toxicol Environ Health 1993; 40: 391-404.
18. Adelman R, Saul RL, Ames BN. *Oxidative damage to DNA: Relation to species metabolic rate and life span.* Proc Natl Acad Sci USA 1988; 85: 2706-8.
19. Loft S, Vistisen K, Ewertz M, Tjonne-land A, Overvad K, Poulsen HE. *Oxidative DNA-damage estimated by 8-hydroxydeoxyguanosine excretion in humans: influence of smoking, gender and body mass index.* Carcinogenesis 1992; 13: 2241-7.
20. Alessio HM. *Exercise-induced oxidative stress.* Med Sci Sports Exerc 1993; 25: 218-24.
21. Poulsen HE, Loft S, Vistisen K. *Increased oxidative DNA damage after 30 days of vigorous exercise.* J Sport Sci 1995; 14: 343-46.
22. Loft S, Astrup A, Buemann B, Poulsen HE. *Oxidative DNA damage correlates with oxygen consumption in humans.* FASEB J 1994; 8: 534-37.
23. Tagesson C, Kallberg M, Leanderson P. *Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by coupled-column high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: A non-invasive assay for in vivo oxidative DNA damage in humans.* Toxicol Methods 1992; 1: 242-51.
24. Prieme H, Loft S, Klarlund M, Gronbaek K, Tonnesen P, Poulsen HE. *Effect of smoking cessation on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7, 8-dihydro-2'-deoxy-guanosine.* Carcinogenesis 1998; 19: 347-51.
25. Park E, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P, Ames BN. *Assay of excised oxidative DNA lesions: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column.* Proc Natl Acad Sci (USA) 1992; 89: 3375-9.
26. Helbock HJ, Beckman KB, Shigenaga MK, Walter PB, Woodall AA, Yeo HC, Ames BN. *DNA oxidation matters: The HPLC-electrochemical detection assay of 8-oxo-deoxyguanosine and 8-oxoguanine.* Proceedings of the National Academy of Science USA 1998; 95: 288-93.

Tab. Prace dotyczące oznaczeń biomarkerów reperacji oksydacyjnych uszkodzeń DNA w moczu pacjentów chorych na nowotwory

Grupa badana	Uszkodzenie	Metoda	Wartości	Autor
10 zdrowych i 20 z nowotworem	dTg	HPLC	435±120 i 347±156 pmol/kg/24 godz.	[30]
10 zdrowych i 20 z nowotworem	Tg	HPLC	174±54 i 125±45 pmol/kg/24 godz.	[30]
2 pacjentów z rakiem przed i po radioterapii	dTg	GC/MS	8–10 i 20–37 nmol/24 godz.	[31]
2 pacjentów z rakiem przed i po radioterapii	8-oksydG	GC/MS	8–14 i 31–40 nmol/24 godz.	[31]
14 chorych z rakiem przed i po chemioterapii Adriamycyną	5-OHMU	GC/MS	74±9 i 96±9 nmol/24h	[32]
7 pacjentów zdrowych i 10 z nowotworem	8-oksydG	HPLC	1,1±0,6 i 1,8 do 3,4 nmol/mmol kreatyniny	[33]
27 zdrowych i 136 z nowotworem	8-oksydG	HPLC	1,1±0,6 i 2,1±1,4 nmol/mmol kreatyniny	[34]
27 zdrowych i 136 z nowotworem	8-oksydG	HPLC	15±8 i 18±11 nmol/24 godz.	[34]
79 pacjentów z nowotworem przed i po chemioterapii	8-oksydG	HPLC	1,9±1,0 i 2,6±2,5 nmol/mmol kreatyniny	[34]

27. Ravanat JL, Guichert P, Tuce Z, Cadet J. *Simultaneous determination of five oxidative DNA lesions in human urine*. Chem Res Toxicol 1999; 12: 802-8.
28. Park E, Shigenaga MK, Degan P, Korn TS, Kitzler JW, Wehr CM, Kolachana P. *Ames BN. Assay of excised oxidative DNA lesions: Isolation of 8-oxoguanine and its nucleoside derivatives from biological fluids with a monoclonal antibody column*. Proc Natl Acad Sci (USA) 1992; 89: 3375-9.
29. Gackowski D, Różalski R, Roszkowski K, Jawień A, Foksiński M, Oliński R. *8-Oxoguanine and 8-oxo-2'-deoxyguanosine levels in human urine do not depend on diet*. Free Radicals Res 2001; 35: 825-32.
30. Cao EH, Wang JJ. *Oxidative damage to DNA: Levels of thymine glycol and thymidine glycol in neoplastic human urines*. Carcinogenesis 1993; 14: 1359-62.
31. Bergtold DS, Berg CD, Simic MG. *Urinary biomarkers in radiation therapy of cancer*. Adv Exp Med Biol 1990; 264: 311-16.
32. Faure H, Coudray C, Mousseau M, Ducros V, Douki T, Bianchini F, Cadet J, Favier A. *5-Hydroxymethyluracil excretion, plasma TBARS and plasma antioxidant vitamins in adriamycin-treated patients*. Free Radicals Biol Med 1996; 20: 979-83.
33. Tagesson C, Kallberg M, Leanderson P. *Determination of urinary 8-hydroxy-deoxyguanosine by coupled-column high-performance liquid chromatography with electrochemical detection: A noninvasive assay for in vivo oxidative DNA damage in humans*. Toxicol Methods 1992; 1: 242-51.
34. Tagesson C, Kallberg M, Klintonberg C, Starkhammar H. *Determination of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine by automated coupled-column high performance liquid chromatography: A powerful technique for assaying in vivo oxidative DNA damage in cancer patients*. Eur J Cancer 1995; 31A: 934-40.
35. Cooke MS, Evans MD, Herbert KE, Lunec J. *Urinary 8-Oxo-2'-Deoxyguanosine – Source, Significance and Supplements*. Free Rad Res 2000; 32: 381-97.

ADRES DO KORESPONDENCJI

dr med. **Krzysztof Roszkowski**
Katedra Biochemii Klinicznej
Akademia Medyczna
ul. Karłowicza 24
85-092 Bydgoszcz
tel. (052) 585 37 45
fax (052) 585 37 71
Roszkowskik@rco.pl

SLOVALGIN

ARMIDEX