

Anatol Panasiuk, Danuta Prokopowicz, <sup>1</sup>Janusz Dziecioł, <sup>2</sup>Maciej Adamski

## APOPTOZA W TKANCE WĄTROBOWEJ W ZAKAŻENIACH HCV

Klinika Obserwacyjno-Zakaźna, Akademia Medyczna w Białymstoku,  
Kierownik: Danuta Prokopowicz

<sup>1</sup>Zakład Anatomii Prawidłowej, Akademia Medyczna w Białymstoku,  
Kierownik: Janusz Dziecioł

<sup>2</sup>Oddział Obserwacyjno-Zakaźny, Szpital Powiatowy w Giżycku,  
Ordynator: Anna Lachowicz-Wawrzyniak

*Wykonano badania immunohistochemiczne wykrywające białka odgrywające istotną rolę w apoptozie komórek (p53 i bcl2) u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C przed i po leczeniu interferonem alfa 2b z rybawiryną. Wykazano przydatność oceny ekspresji białek uczestniczących w apoptozie w prognozowaniu efektu leczenia przeciwwirusowego.*

*Słowa kluczowe: zakażenia HCV, tkanka wątrobowa, apoptoza*  
*Key words: hepatitis C, hepatic tissnes, apoptosis*

### WSTĘP

W patogenezie zakażenia HCV odgrywa istotną rolę wiele czynników jak: genotyp wirusa i jego mutacje, jakość reakcji immunologicznych gospodarza oraz ekspresja wirusowych białek na powierzchni zakażonych komórek (1,2). Większość zakażeń HCV przechodzi w postać przewlekłą, co wynika z trudności rozpoznawania i eliminowania tych patogenów przez układ immunologiczny (3). Reakcja immunologiczna skierowana przeciwko zakażonym hepatocytom powoduje powolne, postępujące procesy zapalne oraz włóknienie wątroby. Replikacja HCV w hepatocytach wpływa na zaburzenia czynnościowe komórek i ich proliferację. Istnieją dowody o znaczącej roli zakażenia HCV w hepatocarcinogenezie (4). Długotrwałe zakażenia wirusem HCV powodują zmiany w materiale genetycznym komórki. Istnieje wiele danych o wpływie zakażenia wirusem HCV na aktywację procesów apoptozy w hepatocytach. W hepatitis C występuje apoptoza komórek parenchymalnych (hepatocytów) oraz komórek nieparenchymalnych m.in. limfocytów wewnątrzwątrobowych (1,5,6,7).

Apoptoza jest ważnym mechanizmem ograniczającym replikację wirusa w zakażonych komórkach (8,9). Wiele wirusów wytworzyło mechanizmy neutralizujące wydzielanie interferonu oraz blokujące geny uczestniczące w apoptozie (9,10). Hepatitis C wirus posiada właściwości zarówno pobudzania, jak i hamowania apoptozy hepatocytów (5). Indukcja apoptozy podczas zakażenia HCV może prowadzić do zapalenia wątroby, podczas gdy konsekwencją zahamowania apoptozy może być przetrwała infekcja. Wydaje się,

że apoptoza hepatocytów odgrywa kluczową rolę w patogenezie hepatitis C, a antywirusowe działanie interferonu alfa może być efektem indukcji apoptozy.

Celem przeprowadzonych badań była ocena ekspresji wewnątrzkomórkowej białek p53 i bcl2 w tkance wątrobowej przed i po leczeniu przeciwwirusowym u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C, wpływu skuteczności leczenia na ekspresję w/w białek oraz korelacja nasilenia ekspresji białek bcl2 i p53 w wątrobie z aktywnością zapalną (grading) i włóknieniem w wątrobie (staging).

## MATERIAŁ I METODY

**Materiał.** Badania przeprowadzono u 30 chorych (10 kobiet, 20 mężczyzn) w wieku  $36,3 \pm 11,6$  lat. Wszyscy chorzy mieli zakażenie HCV utrzymujące się od 6 miesięcy do 5 lat (średnio  $3,6 \pm 1,4$  roku). Zakażenie zostało potwierdzone obecnością przeciwciał anty HCV oraz HCV-RNA w surowicy krwi. W badaniach biochemicznych stwierdzono cechy zapalenia wątroby z podwyższonymi aktywnościami aminotransferaz alaninowej i asparaginianowej. Chorzy zostali zakwalifikowani do leczenia przeciwwirusowego wg typowych kryteriów. Pacjenci byli leczeni: interferonem alfa2b (Intron A, Schering Plough, USA) w dawce 3MU 3x/tydzień/48 tygodni oraz rybawiryną (Ribavirin, Schering Plough, USA) w dawce 1-1,2 g/dobę/48 tygodni. Bezpośrednio po leczeniu i w 6 miesięcy po leczeniu wykonywano badania biochemiczne oraz HCV-RNA. Osoby, u których po zakończeniu leczenia i po 6 miesiącach nie stwierdzono replikacji HCV (HCV-RNA ujemne) oraz aktywności aminotransferaz pozostawały w normie, byli uznawani za wyleczonych (responders – R). Jako nieodpowiadające na leczenie traktowano osoby, u których po zakończeniu leczenia utrzymywało się HCV-RNA w surowicy (non-responders – NR). Biopsje wątroby wykonano przed leczeniem oraz w 6-12 miesięcy po leczeniu IFN $\alpha$ 2b+RBV. Ocena histopatologiczna uwzględniała aktywność zapalną (grading, skala 0-4) i stopień włóknienia (staging, skala 0-4) zgodny z klasyfikacją przewlekłych wirusowych zapaleń wątroby wg Scheuera (11).

**Metody.** Badania były przeprowadzone w materiale tkankowym z biopsji wątroby utrwalonym w 4% zbuforowanej formalinie i następnie zatopionym w parafinie. Preparaty biopsyjne o grubości 4-5  $\mu$ m barwiono rutynowo hematoksyliną i eozyną, kwasem pikrynowym (na tkankę łączną) oraz stosowano barwienie immunohistochemiczne przy użyciu monoklonalnych przeciwciał p53 i bcl2 (Dako Cytomation, Denmark). Przy użyciu mikroskopu świetlnego oceniano odsetek hepatocytów (ilość hepatocytów z pozytywną reakcją w stosunku do 100 komórek) zawierających białko p53 lub bcl2 w 5 polach widzenia (x 400) jednego preparatu.

**Analiza statystyczna.** Uzyskane wyniki badań przedstawiono jako średnią liczbę hepatocytów p53 oraz bcl-2 pozytywnych ( $\pm$ SD) i porównano uzyskane wartości u chorych przed i po leczeniu. Analizę statystyczną dokonano testem t-Studenta dla par, testem chi<sup>2</sup>, a korelację przeprowadzono parametrycznym testem Spearmana.

## WYNIKI

Skuteczne leczenie IFN $\alpha$ 2b+RBV obserwowano u 10 (33%) z 30 chorych. Po leczeniu przeciwwirusowym poprawę histologiczną stwierdzono u 7 z 10 R i u 6 z 20 NR. W przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C o dużej aktywności zapalnej stwier-

dzaliśmy mniejszy odsetek hepatocytów zawierających białko p53 w jądrach, nie były to jednak różnice istotne statystycznie (tabela I).

Tabela I. Odsetek hepatocytów z ekspresją p53 w przewlekłym wirusowym zapaleniu wątroby typu C przed i po leczeniu IFN $\alpha$ 2b + RBV

Table I. Percentage of p53 positive hepatocytes before and after IFN $\alpha$ 2b+RBV treatment in chronic hepatitis C

	Przed leczeniem	Po leczeniu	test t-Studenta, <i>p</i>
p53, total, (%)	37 $\pm$ 28	49 $\pm$ 23	<i>p</i> <0,1
p53 u responders, (%)	43 $\pm$ 30	44 $\pm$ 22	<i>p</i> <0,5
p53 u non-responders, (%)	34 $\pm$ 29	51 $\pm$ 24	<i>p</i> <0,5

U chorych o małej aktywności zapalnej stwierdzono większy odsetek hepatocytów p53 dodatnich. Przed leczeniem, w wątrobie w grupie chorych R notowano większy odsetek komórek, p53 dodatnich niż u NR. Zastosowanie przez 48 tygodni IFN $\alpha$ 2b+RBV u chorych NR wpłynęło na znaczny wzrost liczby hepatocytów p53 dodatnich (z 34% do 51%) wobec R (odpowiednio 43% do 44%). Analizowano zależność między odsetkiem hepatocytów p53 dodatnich a dynamiką zmian histologicznych w wątrobie pod wpływem terapii przeciwwirusowej. Wykazano, że w wątrobie, w której dochodzi do zmniejszenia się aktywności zapalnej (okołowrotnej i śródzrazikowej) oraz włóknienia, znamienne zwiększa się odsetek hepatocytów p53 dodatnich pod wpływem leczenia przeciwwirusowego. Nie zależy to od eliminacji wirusa HCV (tabela II).

Tabela II. Zależność ekspresji białka p53 w hepatocytach od dynamiki zmian histologicznych w tkance wątrobowej po leczeniu IFN $\alpha$ 2b + RBV

Table II. Changes of p53 protein expression in hepatocytes with histological activity of inflammation and fibrosis during IFN $\alpha$ 2b+RBV treatment

		Dynamika zmian histologicznych		
		spadek	wzrost	bez zmian
Aktywność zapalna, grading, (odsetek hepatocytów p53 dodatnich, %)	okołowrotna	64 $\pm$ 15 ( <i>p</i> <0,05)	39 $\pm$ 26*	47 $\pm$ 21*
	wewnątrzrazikowa	61 $\pm$ 15, ( <i>p</i> <0,04)	43 $\pm$ 27*	40 $\pm$ 24*
Włóknienie, staging, (odsetek hepatocytów p53 dodatnich, %)		70 $\pm$ 14, ( <i>p</i> <0,03)	50 $\pm$ 23*	42 $\pm$ 12*

\* brak istotności statystycznej

Wzrost odsetka hepatocytów p53 dodatnich najbardziej zależał od zmniejszenia stopnia włóknienia, a w najmniejszym stopniu od aktywności zapalnej śródzrazikowej. U chorych, u których doszło do nasilenia uszkodzenia tkanki wątrobowej pomimo stosowanego leczenia, odsetek komórek p53 dodatnich znacznie zmniejszał się i zależał głównie od nasilenia aktywności zapalnej okołowrotnej, a w mniejszym stopniu od nasilenia włóknienia. Najmniejszy odsetek komórek p53 dodatnich obserwowano u chorych po leczeniu,

u których nie stwierdzano istotnej dynamiki zmian histologicznych. Analizując intensywność gromadzenia białka p53 stwierdzono, że po leczeniu nastąpił wzrost odsetka hepatocytów z ekspresją białka p53, jednakże nie były to różnice istotne statystycznie (test  $\chi^2$ ,  $p < 0.2$ ). Nie stwierdzono również zależności między intensywnością reakcji p53 a skutecznością leczenia IFN $\alpha$ 2b+RBV (eliminacja HCV).

Przed leczeniem w chorych z wzw C bcl2 występowało w 92 $\pm$ 12% hepatocytach i w 37 $\pm$ 26% limfocytach wewnątrzwątrobowych (tabela III).

Tabela III. Odsetek hepatocytów i limfocytów wewnątrzwątrobowych z ekspresją białka bcl2 przed i po leczeniu IFN $\alpha$ 2b+RBV u chorych z przewlekłym wirusowym zapaleniem wątroby typu C

Table III. Percentage of bcl2 positive hepatocytes and liver associated lymphocytes before and after IFN $\alpha$ 2b+RBV treatment in chronic hepatitis C

	Przed leczeniem	Po leczeniu	<i>P</i>
Total, n=30			
Hepatocyty (%)	92 $\pm$ 12	87 $\pm$ 11	<i>P</i> <0,05
Limfocyty (%)	37 $\pm$ 26	27 $\pm$ 21	NS
Responders, n=10			
Hepatocyty (%)	87 $\pm$ 15	83 $\pm$ 20	NS
Limfocyty (%)	28 $\pm$ 18	26 $\pm$ 10	NS
Non-responders, n=20			
Hepatocyty (%)	94 $\pm$ 32	88 $\pm$ 21	<i>P</i> <0,05
Limfocyty (%)	39 $\pm$ 29	28 $\pm$ 12	NS

NS – brak istotności statystycznej

U osób, które wyeliminowały HCV w wyniku leczenia (R) ekspresja białka bcl2 przed leczeniem była niższa i wynosiła 87 $\pm$ 15% i 28 $\pm$ 18% odpowiednio. W przeciwieństwie u NR przed leczeniem stwierdzono wyższy odsetek komórek zawierających białko bcl2 w 94 $\pm$ 32 hepatocytach i 39 $\pm$ 29% limfocytach wewnątrzwątrobowych. Leczenie IFN $\alpha$ 2b+RBV wpłynęło na zmniejszenie kumulacji białka bcl2 w hepatocytach i limfocytach wewnątrzwątrobowych ( $p < 0,05$ ). U chorych ze skutecznym leczeniem przeciwwirusowym obserwowano najniższy odsetek limfocytów i hepatocytów zawierających białko bcl2 przed i po leczeniu. Nie stwierdzono jednak różnic istotnych statystycznie w ekspresji białka bcl2 w wątrobie między R i NR zarówno przed jak i po leczeniu. Nie stwierdzono korelacji między ekspresją bcl2 a dynamiką zmian histologicznych w wątrobie, zarówno w grupie chorych ze wzrostem jak i zmniejszeniem aktywności zapalnej oraz włóknienia.

## DYSKUSJA

Przeprowadzone badania wskazują, że obecność białka p53 w tkance wątrobowej świadczy o potencjalnych możliwościach regeneracji komórek wątrobowych. Wykazano, że większy odsetek hepatocytów z ekspresją białka p53 występuje w chorych, u których uzyskano

eliminację zakażenia HCV, niż u nieodpowiadających na leczenie. Analizując dynamikę zmian morfologicznych pod wpływem leczenia przeciwwirusowego stwierdzono, że w tkankach wykazujących cechy regeneracji (zmniejszenie aktywności zapalnej i stopnia włóknienia) liczba komórek zawierających białko p53 była wyższa niż w tkankach z postępującym uszkodzeniem. Sugeruje się, że p53 odgrywa podwójną rolę: eliminacji komórek w wyniku apoptozy, jak też wpływa na proliferację komórek (12). Zakłada się, że p53 zwiększa proliferację hepatocytów poprzez wpływ na czynniki wzrostowe. Zwiększenie stężenia czynnika wzrostu hepatocytów (HGF) w hodowlach hepatocytów powoduje zwiększenie białka p53 (12). Udział p53 w regeneracji hepatocytów potwierdza znaczny wzrost tego białka w kilka godzin po częściowej hepatektomii u szczurów. Koreluje to ze wzrostem stężenia HGF i TGF $\alpha$  (12). W innych naszych badaniach wpływu interferonoterapii na stężenie czynników wzrostowych (13) stwierdziliśmy, że wzmoczonej regeneracji tkanki wątrobowej towarzyszy wzrost stężenia HGF. Zatem wzrost ekspresji białka p53 może być markerem prognozującym pozytywny efekt leczenia i eliminację wirusa HCV. Stwierdziliśmy, że po IFN $\alpha$ 2b+RBV terapii, w tkance wątrobowej wzrost odsetka hepatocytów p53 dodatnich najbardziej zależał od zmniejszenia stopnia włóknienia, a w najmniejszym stopniu od aktywności zapalnej śródzrazikowej. Zwiększenie ekspresji białka p53 w hepatocytach dowodzi wzmoczonych procesów regeneracji a w mniejszym stopniu uszkodzenia genomu komórek pod wpływem leczenia. Przeprowadzone badania wykazały, że również u *nonresponders*, u których notowano poprawę histologiczną przy utrzymującym się zakażeniu HCV, doszło do znamiennej wyższej ekspresji białka p53. Wydaje się, że może to być efektem regulującego działania IFN na procesy zapalne oraz pobudzającym wpływem na procesy regeneracji zakażonych komórek.

Zakażenie HCV istotnie zaburza cykl komórkowy hepatocytów. *Skopelitou* i wsp. wykazali zwiększoną ekspresję p53 w hepatocytach u chorych zakażonych HBV oraz HCV w porównaniu do osób niezakażonych (4). Białka rdzeniowe HCV odgrywające istotną rolę w patogenezie zakażenia HCV decydują o losie zakażonych komórek, zarówno o ich replikacji jak i apoptozie (6, 10, 14, 15). Białka HCV wpływają bezpośrednio lub pośrednio na apoptozę hepatocytów (16). Bardzo prawdopodobny jest mechanizm immunologicznej indukcji apoptozy w przewlekłych zakażeniach HCV (9). Stopień apoptozy komórek wątrobowych dodatkowo koreluje ze stopniem aktywności zapalnej i liczbą wewnątrzwątrobowych komórek CD8 (17). Apoptoza jest regulowana przez produkty ekspresji różnych genów, w tym z rodziny bcl2, wśród których znajdują się inhibitory (bcl2, bcl-x1, mcl-10) i promotory apoptozy (Bax, Bak, Bok, Bad). Proto-onkogen bcl2 zlokalizowany na wewnętrznej błonie mitochondriów blokuje programowaną śmierć komórki (18). Nadekspresja genu bcl2 prowadzi do hamowania apoptozy i umożliwia przeżycie komórek m. in. nowotworowych, zakażonych (19). Wrażliwość komórek na czynniki stymulujące apoptozę może być także regulowana stosunkiem białek pro- i antyapoptotycznych. Region NS5A wirusa wydaje się być wrażliwy na wpływ interferonu. Interferon hamując aktywność kinazy RNA wirusa wpływa na jego replikację (10). Białko NS5A wpływa na aktywność białek bcl2 i p53 (2, 14). Efektem tego jest blokujący wpływ na mechanizmy apoptozy komórek zakażonych wirusem HCV. Apoptoza hepatocytów indukowana przez p53 jest przerywana przez dodanie NS5A i koreluje ze stopniem łączenia tego antygeny z p53. Nie stwierdza się zależności między intensywnością apoptozy a poziomem aminotransferaz jak też wiramią i genotypem HCV (17).

U wszystkich pacjentów poddanych leczeniu IFN $\alpha$ 2b+RBV stwierdzano znaczne zmniejszenie kumulacji białka bcl2 w hepatocytach i w mniejszym stopniu w limfocytach wewnątrzwątrobowych. Dowodzi to, że interferon alfa z rybawiryną wpływa na stężenie bcl2 w wątrobie, a tym samym wywiera efekt pobudzający apoptozę hepatocytów i limfocytów wewnątrzwątrobowych. Przed leczeniem stwierdzaliśmy, że apoptoza u NR jest bardziej zahamowana niż u R. Pod wpływem IFN $\alpha$ 2b+RBV w grupie chorych NR ekspresja białka bcl2 ulega obniżeniu jednak w mniejszym stopniu niż u responders. U chorych, którzy wyeliminowali zakażenie HCV po leczeniu zmniejszył się odsetek komórek z ekspresją białka bcl2. W przeprowadzonych przez nas badaniach nie wykazano istotności statystycznej między ekspresją białka bcl2 a histologiczną aktywnością i włóknieniem w wątrobie.

## WNIOSKI

Wydaje się, że apoptoza jest głównym procesem prowadzącym do eliminacji zakażenia HCV. Jednakże aktywacja apoptozy w tej chorobie nie jest jasna. Przeciwwirusowe leczenie jest potencjalnym sygnałem do aktywacji apoptozy, jednakże potrzebne są dalsze badania nad tym zjawiskiem.

*A Panasiuk, D Prokopowicz, J Dzięcioł, M Adamski*

## THE APOPTOSIS IN HEPATIC TISSUES IN HEPATITIS C

### SUMMARY

**Objective:** The purpose of the study was the evaluation of p53 and bcl2 protein expression on intrahepatic hepatocytes in chronic hepatitis C before and after the treatment with interferon alpha 2b (IFNa2b) combined with ribavirin (RBV).

**Methods:** using immunohistochemical method, the percentage of cells with p53 and bcl2 protein expression was assessed in hepatic tissues of 30 patients suffering from chronic hepatitis C. The examinations were performed in hepatic biotates before IFNa2b treatment (9MU/week/48weeks) combined with RBV (1-1.2g/24hrs/48weeks) and after the therapy. The parameters were analyzed in the responders group (R) and non-responders (NR).

**Results:** The highest increase in p53 protein expression was observed in tissues in which interferon alpha decreased inflammatory activity and fibrosis. The elimination of HCV infection did not have any influence on p53 protein expression. The diminishment of p53 positive hepatocyte percentage was revealed in tissues where inflammatory activity and fibrosis did not change before and after the treatment or where histological damage was intensified. IFNa2b+RBV therapy diminished bcl2 positive cell percentage, specifically in patients with eliminated HCV.

**Conclusions:** Tissue p53 protein expression increase and bcl-2 decrease can be a prognostic marker as far as a positive effect of IFNa2b+RBV treatment and HCV elimination are concerned. It can occur either due to the elevation of growth factors inducing regeneration or HCV-infected hepatocyte apoptosis. It was shown that IFNa2b+RBV therapy decreases bcl2 protein expression, which can make hepatocyte apoptosis and HCV elimination possible.

## PIŚMIENNICTWO

1. Nasir A, Arora HS, Kaiser HE. Apoptosis and pathogenesis of viral hepatitis C-an update. In *Vivo* 2000;14:297-300.
2. Reyes GR. The nonstructural NS5A protein of hepatitis C virus: an expanding, multifunctional role in enhancing hepatitis C virus pathogenesis. *J Biomed Sci* 2002;9:187-97.
3. Pavio N. The hepatitis C virus persistence: how to evade the immune system? *J Biosci* 2003;28:287-304.
4. Skopelitou A, Hadjiyannakis M, Alexopoulou V, i in. p53 expression in hepatocellular carcinoma in Greece. Correlation with epidemiological and histopathological data. *Pathol Res Pract* 1996; 192:1100-106.
5. Kountouras J, Zavos C, Chatzopoulos D. Apoptosis in hepatitis C. *J Viral Hepat* 2003;10:335-42.
6. Ray RB, Meyer K, Steele R, i in. Inhibition of tumor necrosis factor (TNF-alpha)-mediated apoptosis by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem* 1998;273:2256-9.
7. Rubbia-Brandt L, Taylor S, Gindre P i in. Lack of in vivo blockade of Fas- and TNFR1-mediated hepatocyte apoptosis by the hepatitis C virus. *J Pathol* 2002;197:617-23.
8. Levin AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88:323-31.
9. Teodoro JG, Branton PE. Regulation of apoptosis by viral gene products. *J Virol* 1997;71:1739-46.
10. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, i in. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-10.
11. Scheuer PJ. Classification of chronic viral hepatitis: A need for reassessment. *J Hepatol* 1991; 13:696-9.
12. Inoue Y, Tomiya T, Yanase M, i in. p53 may positively regulate hepatocyte proliferation in rats. *Hepatology* 2002;36:336-44.
13. Panasiuk A, Flisiak R, Prokopowicz D. Effect of interferon alpha 2a plus ribavirin treatment on selected growth factors in respect to inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. *World J Gastroenterol*, w druku.
14. Lu W, Lo SY, Chen M i in. Activation of p53 tumor suppressor by hepatitis C virus core protein. *Virology* 1999;264:134-41.
15. Ray RB, Lagging LM, Meyer K, i in. Transcriptional regulation of cellular and viral promoters by the hepatitis C virus core protein. *Virus Res* 1996;37:209-20.
16. Patel T, Steer CJ, Gores GJ. Apoptosis and the liver: a mechanism of disease, growth regulation, and carcinogenesis. *Hepatology* 1999;30:811-15.
17. Calabrese F, Pontisso P, Pettenazzo E i in. Liver cell apoptosis in chronic hepatitis C correlates with histological but not biochemical activity or serum HCV-RNA levels. *Hepatology* 2000;31: 1153-9.
18. Kroemer G. The proto-oncogenic Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med* 1997;3: 614-20.
19. Guo XZ, Shao XD, Liu MP i in. Effect of bax, bcl-2 and bcl-xL on regulating apoptosis in tissues of normal liver and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 2002;8:1059-62.

**Adres autora:**

dr hab. med. Anatol Panasiuk  
Klinika Obserwacyjno-Zakaźna  
Akademia Medyczna w Białymstoku  
ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok  
tel./fax (85) 741 69 21  
e-mail: [apanasiuk@wp.pl](mailto:apanasiuk@wp.pl)