

ANALÝZA ANGIOGENEZE V KOSTNÍ DŘENI U PLAZMOCYTÁRNÍHO MYELOMU

Tichý M.¹, Tichá V.¹, Ščudla V.², Šváchová M.¹, Zapletalová J.³

¹Ústav patologie LF UP a FNOI

²III. interní klinika LF UP a FNOI

³Ústav lékařské biofyziky LF UP, Olomouc

Souhrn

Autoři sledovali angiogenezi v trepanobiopsických vzorcích z lopaty kosti kyčelní celkem u 51 pacientů s dosud neléčeným plazmocytárním myelomem (MM). Mikrovazální hustota s přepočtem na 1 mm² byla znázorněna monoklonálními protilátkami proti CD34 a nestinu. Bylo zjištěno, že proliferující cévy značené protilátkou proti nestinu se téměř nevyskytují u intersticiálního typu infiltrace. Množství proliferujících cév v nodulárních infiltrátech je výrazně menší ve srovnání s kapilární sítí značenou protilátkou proti CD34. Hustota proliferujících cév v nodulárních infiltrátech významně koreluje s proliferačním indexem Ki67 myelomových buněk, nikoliv však se stupněm diference MM.

Klíčová slova: plazmocytární myelom – angiogeneze – kostní dřev – CD34 – nestin

Summary

Analysis of Bone Marrow Angiogenesis in Multiple Myeloma

The authors studied angiogenesis in trephine biopsy samples taken from the hip bone from a total of 51 patients with an as yet untreated plasma cell myeloma / multiple myeloma (MM). Microvessel density calculated to 1 mm² was represented by monoclonal antibodies against CD34 and nestin. It was discovered that proliferating vessels labeled with anti-nestin antibody nearly never occur in the interstitial type of infiltration. The amount of proliferating vessels in nodular infiltrates is significantly lower compared to the capillary network labeled with antibodies against CD34. The density of proliferating vessels in nodular infiltrates significantly correlates with the proliferation index Ki67 of myeloma cells, not, however, with the degree of MM differentiation.

Key words: plasma cell myeloma – angiogenesis – bone marrow – CD34 – nestin

Čes.-slov. Patol., 46, 2010, No. 1, p. 15–19

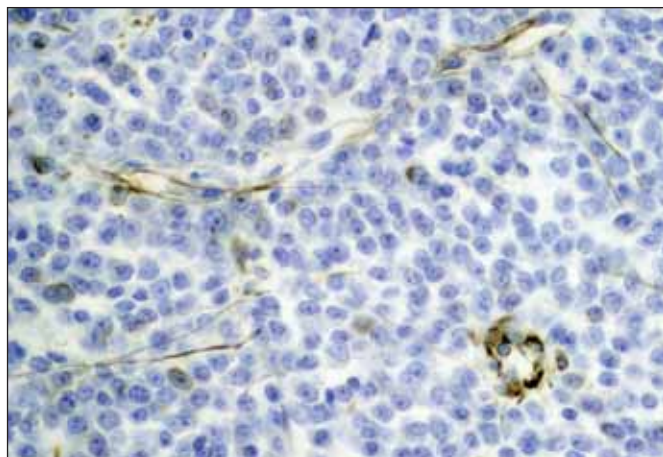
Angiogeneze, tedy novotvorba cév, se fyziologicky vyskytuje při embryogenezi. V dospělosti pak za různých patologických stavů, zejména při reparaci. Angiogeneze má velký význam při nádorových onemocněních. Je prokázáno, že nádor od určité velikosti (asi 1 mm³) nemůže bez aktivace angiogeneze dále proliferovat. Aktivace angiogeneze s následnou progresí tumoru závisí na schopnosti stimulovat hlavně prostřednictvím angiogenních faktorů cévy v okolní tkáni k proliferaci. Dnes je známo více než 20 endogenních promotorů a poněkud menší počet inhibitorů angiogeneze. Jsou produkovány nádorovými, stromálními a zánětlivými buňkami (2, 7, 8, 21). Mezi prvními hematologickými malignitami, kde byla angiogeneze ve vztahu k progresi onemocnění sledována, byl plazmocytární myelom/mnohotný myelom (MM) (6, 12–14, 17–20, 22). Bylo prokázáno, že i u MM dochází k význačné novotvorbě krevních cév v kostní dřevě ve srovnání s normálními poměry a byl shledán určitý vztah k aktivitě a prognóze nemoci. Mezi prvními byl u MM prokázán terapeutický efekt antiangiogenní léčby thalidomidem. Zdá se, že podobně jako v případech solidních tumorů, jsou jedním ze zdrojů uvolňovaných angiogenních cytokinů nádorové buňky, tedy proliferující neoplasticky transformované plazmocyty. Jedním z běžně používaných markerů označujících endotelie krevních cév je antigen CD34. Neodliší však proliferující cévy od stávající vaskulární sítě. Je prokázáno, že výhradně proliferující endotelie exprimují nestin (10, 11). Nestin je protein intermediárních filament objevený v roce 1985 (4). Je považován za marker neuronálních kmenových a progenitorových

buněk, buněk svalové diference řady a v současnosti je zkoumána jeho exprese i u jiných buněčných typů včetně buněk nádorových (3, 5).

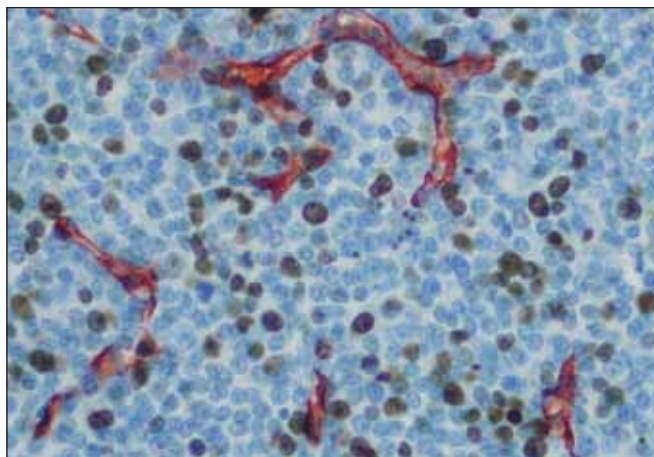
Ve své práci jsme v infiltrátech plazmocytárního myelomu v kostní dřevě sledovali hustotu proliferujících cév značených protilátkou proti nestinu ve vztahu k typu nádorové infiltrace, stupni její diference a proliferační aktivity a celkové mikrovazální hustotě značené protilátkou proti CD34. Domníváme se, že stanovení hustoty proliferující vaskulární sítě se může stát jedním z důležitých faktorů cílené léčby.

MATERIÁL A METODIKA

Vyšetřili jsme soubor 51 pacientů s nově diagnostikovaným MM. Použili jsme materiál z našeho registru získaný v rozmezí 12 let (1998–2009). Šlo o trepanobiopsické vzorky z lopaty kosti kyčelní. Část vzorků z dřívějších let byla fixována 10% formalinem, dekalifikována 10% chelatonem a zalita do parafinu. Část vzorků z posledních let byla fixována a dekalifikována v Löwyho roztoku. Řezy tloušťky 2–3 μm byly barveny HE a standardní sadou speciálních barvení (Giemsa, PAS, Fe, Gomory, naftol-ASD-chloracetáteteráza). V imunohistochemickém vyšetření jsme použili monoklonální protilátky CD 138 (DakoCytomation, klon MI-15), lehké řetězce Ig kappa (IMMUNOTECH, klon KP-33) a lambda (IMMUNOTECH, klon HP-6054) ke stanovení typu, kvantity



Obr. 1 MM nodulární infiltrát, nestin, 400krát



Obr. 2 MM nodulární infiltrát, dvojitá imunohistochemická barvení, CD34 – červený chromogen, Ki67 – hnědý chromogen, 400krát

a klonality infiltrace. Proliferační aktivita nodulárních infiltrátů byla hodnocena semikvantitativně pomocí indexu Ki67 (DakoCytomation, klon MIB-1) odhadem procenta proliferujících myelomových buněk ($\leq 5\%$, $< 20\%$, $\geq 20\%$). Vaskulární síť byla značena monoklonální protilátkou CD34 (DakoCytomation, klon QBEnd 10) a proliferující cévy monoklonální protilátkou proti nestinu (MILLIPORE, LV1434883). K vizualizaci byl použit set Dako EnVision™ Dual Link Systém-HRP a DakoCytomation EnVision+Systém-HRP(AEC).

Mikrovazální hustota byla hodnocena obdobně jako v naší předchozí práci (18) pomocí kalibrované mřížky při zvětšení 400krát na ploše $0,141\text{mm}^2$. Cévy byly počítány ve třech různých lokalizacích, které při přehledném zvětšení vykazovaly největší mikrovazální hustotu (tzv. „hot spots“). Průměrný počet cév byl přepočítán na plochu 1mm^2 . Stupeň diference MM byl stanoven dle kritérií Bartla a spol. (1) na G_1 , G_2 , G_3 . Pozorovali jsme dva základní typy nádorové infiltrace: intersticiální a nodulární. Pravidelnou součástí nodulárních infiltrátů byla i infiltrace intersticiální. Byla však při posuzování cévní hustoty nevýznamná, protože hustota kapilár zde byla vždy v pozadí ve srovnání s nodulárními okrsky.

Ke statistickému zpracování dat byl použit software SPSS, v. 15 (SPSS Inc., Chicago, USA). Pro porovnání počtu cév značených protilátkou proti CD34 a protilátkou proti nestinu byl použit Wilcoxonův párový test. Pro porovnání počtu cév v intersticiální infiltraci a nodulárních infiltrátech značených protilátkou proti nestinu byl použit Mann-Whitney U-test, stejně jako při porovnání počtu proliferujících cév v nodulárních infiltrátech se stupněm diference MM. Závislost počtu proliferujících cév na proliferčním indexu Ki67 v nodulárních infiltrátech MM byla zhodnocena pomocí Spearmanovy neparametrické korelační analýzy.

VÝSLEDKY

V souboru 51 dosud neléčených pacientů s MM (první záchyt) bylo 28 mužů a 23 žen. Průměrný věk mužů v době stanovení diagnózy byl 60,5 roků (věkové rozpětí 32–86 let), žen 60,1 roků (věkové rozpětí 42–76 let).

Dvacet šest MM bylo klasifikováno jako G_1 , 15 – G_2 a 10 – G_3 . Výsledky jsou shrnuty v tabulkách 1–6.

Tab. 1. Plazmocytární myelom G_1 , intersticiální infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přepoččet cév na 1mm^2		diference	infiltrace
			CD34	nestin		
1.	M	50	84,0	0,0	G_1	I
2.	M	53	49,0	0,0	G_1	I
3.	M	52	35,0	0,0	G_1	I
4.	M	63	76,0	0,0	G_1	I
5.	M	56	52,0	0,0	G_1	I
6.	M	52	64,0	0,0	G_1	I
7.	M	62	33,0	0,0	G_1	I
8.	M	67	33,0	0,0	G_1	I
9.	M	68	31,0	0,0	G_1	I
10.	M	86	43,0	0,0	G_1	I
11.	Ž	52	42,0	2,3	G_1	I
12.	Ž	62	52,0	7,1	G_1	I
13.	Ž	60	49,7	0,0	G_1	I
14.	Ž	60	23,6	0,0	G_1	I
15.	Ž	61	26,0	0,0	G_1	I
16.	Ž	69	28,4	0,0	G_1	I
17.	Ž	70	28,6	0,0	G_1	I

Tab. 2. Plasmocytární myelom G2, intersticiální infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přečet cív na 1 mm ²		diferenciace	infiltrace
			CD34	nestin		
1.	M	46	68,6	0,0	G2	I
2.	M	66	30,5	2,3	G2	I
3.	M	79	57,8	0,0	G2	I
4.	Ž	62	59,2	0,0	G2	I

Tab. 3. Plasmocytární myelom G3, intersticiální infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přečet cív na 1 mm ²		diferenciace	infiltrace
			CD34	nestin		
1.	M	75	80,5	0,0	G3	I
2.	M	32	71,0	0,0	G3	I
3.	Ž	48	79,0	0,0	G3	I
4.	Ž	50	64,0	0,0	G3	I

Tab. 4. Plasmocytární myelom G1, nodulární infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přečet cív na 1 mm ²		proliferační index Ki67	diferenciace	infiltrace
			CD34	nestin			
1.	M	46	66,3	0,0	5 %	G1	N
2.	M	52	101,8	2,3	5 %	G1	N
3.	M	60	80,5	7,1	10 %	G1	N
4.	M	61	92,3	9,5	15 %	G1	N
5.	M	56	59,2	7,1	15 %	G1	N
6.	Ž	73	81,0	0,0	5 %	G1	N
7.	Ž	42	49,0	0,0	5 %	G1	N
8.	Ž	50	101,8	2,3	5 %	G1	N
9.	Ž	45	85,2	9,5	15 %	G1	N

Tab. 5. Plasmocytární myelom G2, nodulární infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přečet cív na 1 mm ²		proliferační index Ki67	diferenciace	infiltrace
			CD34	nestin			
1.	M	63	111,20	4,70	5 %	G2	N
2.	M	55	89,90	0,00	5 %	G2	N
3.	M	62	73,10	16,50	10 %	G2	N
4.	M	48	51,80	18,90	15 %	G2	N
5.	M	65	51,80	4,70	15 %	G2	N
6.	M	59	104,10	11,80	20 %	G2	N
7.	Ž	51	99,40	9,50	10 %	G2	N
8.	Ž	57	97,03	14,20	10 %	G2	N
9.	Ž	61	57,50	9,50	10 %	G2	N
10.	Ž	72	134,90	56,80	20 %	G2	N
11.	Ž	62	52,00	18,80	40 %	G2	N

Na základě zjištěných rozdílů v počtu cív značených protilátkou proti CD34 a protilátkou proti nestinu v infiltrátech MM lze konstatovat několik poznatků:

1. V intersticiálním typu infiltrace se proliferující cévy exprimující nestin téměř nevyskytovaly. Wilcoxonovým párovým testem byl prokázán u MM G₁ signifikantně vyšší počet cív značených protilátkou proti CD34 (medián počtu cív 42) ve srovnání s počtem cív značených protilátkou

proti nestinu (medián počtu cív 0). Signifikance testu $p = 0,0003$.

V případě MM G₂ a MM G₃ nebylo porovnání možné pro malý počet případů. Celkově pak u všech případů MM byl v intersticiální infiltraci prokázán signifikantně vyšší počet cív značených protilátkou proti CD34 (medián počtu cív 50) ve srovnání s počtem cív značených protilátkou proti nestinu (medián počtu cív 0). Signifikance testu $p < 0,0001$.

Tab. 6. Plazmocytární myelom G3, nodulární infiltrace

č.	pohlaví	věk (r.)	přečet cív na 1 mm ²		proliferální index Ki67	diferenciace	infiltrace
			CD34	nestin			
1.	M	65	116,00	9,50	5 %	G3	N
2.	M	84	85,20	33,13	10 %	G3	N
3.	Ž	75	120,70	0,00	5 %	G3	N
4.	Ž	56	137,20	14,20	5 %	G3	N
5.	Ž	76	123,10	9,50	5 %	G3	N
6.	Ž	70	113,60	9,50	5 %	G3	N

2. V nodulárních infiltrátech MM byla situace obdobná. U MM G₁ byl signifikantně vyšší počet cív značených protilátkou proti CD34 (medián počtu cív 81) ve srovnání s počtem cív značených protilátkou proti nestinu (medián počtu cív 2). Signifikance testu $p = 0,008$. Stejně tak byly signifikantně vyšší počty cív u MM G₂ a MM G₃ značených protilátkou proti CD34 (medián počtu cív 90, resp. 118) ve srovnání s počtem cív značených protilátkou proti nestinu (medián počtu cív 12, resp. 10). Signifikance testu $p = 0,003$ resp. $0,028$. Rovněž celkově bez přihlídnutí k diferenciaci MM byl v nodulárních infiltrátech signifikantně vyšší počet cív značených protilátkou proti CD34 (medián počtu cív 91) ve srovnání s počtem cív značených protilátkou proti nestinu (medián počtu cív 10). Signifikance testu $p < 0,0001$.

3. Pomocí Mann-Whitney U-testu byl v nodulárních infiltrátech MM prokázán signifikantně vyšší počet cív značených protilátkou proti nestinu (medián počtu cív 10) ve srovnání s počty cív takto značených v intersticiální infiltraci (medián počtu cív 0). Signifikance testu $p < 0,0001$.

4. Mann-Whitney U – test neprokázal v nodulárních infiltrátech signifikantní rozdíly v počtu cív značených nestinem v závislosti na diferenciaci MM. Mezi G₁ – G₂ ($p = 0,084$), G₁ – G₃ ($p = 0,270$), G₂ – G₃ ($p = 1,0$).

5. Spearmanovou neparametrickou korelační analýzou jsme dále zjišťovali zda u nodulárních infiltrátů koreluje počet cív exprimujících nestin s proliferálním indexem Ki67 myelomových buněk. Byla prokázána velmi silná pozitivní korelace ($r = 0,903$) u MM G₁ a středně silná pozitivní korelace ($r = 0,673$) u MM G₂. U MM G₃ nebyla významná korelace prokázána. Celkově však, bez přihlídnutí ke stupni diferenciaci MM, byla prokázána středně silná pozitivní korelace ($r = 0,614$) mezi počtem cív exprimujících nestin a vyšší proliferací indexu Ki67.

DISKUSE

Sledování angiogeneze u solidních nádorů a některých hematologických malignit včetně MM poukazuje na skutečnost, že méně diferencované a většinou i agresivnější nádory jsou charakterizovány větší vaskulární hustotou (12–14, 16, 17, 20).

Ověřili jsme si naše poznatky z dřívější studie (18, 19) o úzkém vztahu mezi hustotou vaskulární sítě, stupněm diferenciaci a typem infiltrace kostní dřeně myelomovými buňkami. Pravidelně nejhustější vaskularizaci jsme pozorovali v nodulárních infiltrátech méně diferencovaných forem MM. Naopak nejmenší vaskularizace byla přítomna u případů dobře diferencovaných, s intersticiálním typem infiltrace.

V nynější práci jsme se zaměřili zejména na posouzení jak velké množství cív značených protilátkou proti CD34 exprimuje současně nestin a je tedy v proliferální fázi. Výsledky ukázaly, že hustota proliferujících cív je daleko menší než kapilární síť značená protilátkou proti CD34 a souvisí s typem infiltrace a proliferací aktivitou MM. Lze konstatovat, že

výskyt proliferujících cív v intersticiální infiltraci je zcela zanedbatelný, bez ohledu na stupeň diferenciaci MM. Nároky myelomových buněk na přívod kyslíku a živin jsou zde zřejmě v převaze dostačujícím způsobem hrazeny stávající vaskulární sítí a k aktivaci angiogeneze nedochází. V nodulárních infiltrátech je hustota proliferujících cív rovněž menší ve srovnání s mikrovazální denzitou značenou protilátkou proti CD34. Bez signifikantní závislosti na stupni diferenciaci MM korelovala proliferující mikrovazální hustota s jeho proliferací aktivitou. Výskyt proliferujících cív byl větší v nodulárních infiltrátech s vyšší proliferací aktivitou myelomových buněk. Největší hustotu proliferujících cív jsme pozorovali v nodulárních infiltrátech s proliferací indexem Ki67 vyšším než 20 %. Daleko menší byl výskyt proliferujících cív v nodulárních infiltrátech, kde index Ki67 nepřesáhl 5 %. Je tedy zřejmé, že proliferující vaskularizace pozitivně koreluje s růstem nodulárních infiltrátů MM a v případech relativní růstové stacionárnosti infiltrátů je výskyt proliferujících cív minimální. Tedy „proliferující vaskulární fáze“ MM úzce souvisí s aktivitou onemocnění a je prakticky málo významné, zda se jedná o MM dobře nebo níže diferencované. Domníváme se, že získané poznatky mohou přispět k účelné aplikaci antiangiogenní léčby v terapeutickém spektru onkologických onemocnění. Důležité z tohoto hlediska bude posouzení nejenom intenzity angiogeneze, ale zejména intenzity proliferující angiogeneze.

Zajímavý nález jsme učinili u celkem 9 případů MM, kde v části populace myelomových buněk byla v cytoplazmě přítomna exprese nestinu. Expresí nestinu nekorelovala s diferenciací MM a vyskytovala se u dobře i málo diferencovaných forem. Je otázkou, zda exprese nestinu v některých myelomových buňkách nemůže souviset s hypotézou existence nádorových kmenových buněk, které analogicky jako kmenové buňky normálních tkání jsou schopny obnovy a tvorby diferencovanějších buněk nádoru (9, 15).

Práce byla podpořena grantem IGA MZ ČR č. NR/9500-3

LITERATURA

1. Bartl, R., Frisch, B., Fateh-Moghadam, A. et al.: Histologic classification and staging of multiple myeloma. A retrospective and prospective study of 674 cases. *Am. J. Clin. Pathol.*, 87, 1987, s. 342–355.
2. Bellamy, W. T., Richter, L., Frutiger, Y. et al.: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Canc. Res.*, 59, 1999, s. 728–733.
3. Ehrmann, J., Kolář, Z., Mokry, J.: Nestin as a diagnostic and prognostic marker: immunohistochemical analysis of its expression in different tumours. *J. Clin. Pathol.*, 58, 2005, s. 222–223.
4. Hockfield, S., McKay, R. D.: Identification of major cell classes in the developing mammalian nervous system. *J. Neurosci.*, 5, 1985, s. 3310–3328.
5. Kolář, Z., Ehrmann, J., Turashvili, G. et al.: A novel myoepithelial progenitor cell marker in the breast? *Vichows Arch.*, 450, 2007, s. 607–609.

6. Kumar, S., Fonseca, R., Dispenzieri, A. et al.: Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma: effect of therapy. Br. J. Haematol., 119, 2002, s. 665–671.
7. Kumar, S., Witzig, T. E., Timm, M. et al.: Expression of VEGF and its receptors by myeloma cells. Leukemia, 17, 2003, s. 2025–2031.
8. Mangi, M. H., Newland, E.: Angiogenesis and angiogenic mediators in haematological malignancies. Br. J. Haematol., 111, 2000, s. 43–51.
9. Matsui, W., Huff, C. A., Wang, Q. et al.: Characterization of clonogenic multiple myeloma cells. Blood, 103, 2004, s. 2332–2336.
10. Mokřý, J., Němeček, S.: Cerebral angiogenesis shows nestin expression in endothelial cells. Gen. Physiol. Biophys., 18, 1999, s. 25–29.
11. Mokřý, J., Cizková, D., Filip, S. et al.: Nestin expression by newly formed human blood vessels. Stem Cells Dev., 13, 2004, s. 658–664.
12. Munshi, N. C., Wilson, C.: Increased bone marrow microvessel density in newly diagnosed multiple myeloma carries a poor prognosis. Semin. Oncol., 28, 2001, s. 565–569.
13. Pruneri, G., Ponzoni, M., Ferrari, A. S. et al.: Microvessel density, a surrogate marker of angiogenesis, is significantly related to survival in multiple myeloma patients. Br. J. Haematol., 118, 2002, s. 817–820.
14. Rajkumar, S. V., Leong, T., Roche, P. C. et al.: Prognostic value of bone marrow angiogenesis in multiple myeloma. Clin. Cancer Res., 6, 2000, s. 3111–3116.
15. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. et al.: Stem cells cancer, and cancer stem cells. Nature, 414 (6859), 2001, s. 105–111.
16. Ryška, A., Hovorková, E., Ludvíková, M.: Angiogeneze v nádorech. Část II. Metody a význam kvantifikace angiogeneze jako prognostický ukazatel a cíl možných léčebných postupů. Čes.–slov. Patol., 36, 2000, s. 71–80.
17. Sezer, O., Niemoller, K., Encker, J. et al.: Bone marrow microvessel density is a prognostic factor for survival in patients with multiple myeloma. Ann. Hematol., 79, 2000, s. 574–577.
18. Tichá, V., Tichý, M., Ščudla, V. et al.: Angiogeneze v kostní dřeni pacientů s plazmocytárním myelomem jako ukazatel biologického chování. Čes.–slov. Patol., 42, 2006, s. 115–119.
19. Tichá, V., Tichý, M., Ščudla, V. et al.: Bone marrow angiogenesis in multiple myeloma after high-dose chemotherapy and autologous haematopoietic cell transplantation. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub., 150(Suppl.1) 2006, s.66–70.
20. Vacca, A., Ribatti, D., Runcali, L. et al.: Bone marrow angiogenesis and progression in multiple myeloma. Br. J. Haematol., 87, 1994, s. 503–508.
21. Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M. et al.: Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. Blood, 93, 1999, s. 3064–3073.
22. Vacca, A., Ria, R., Ribatti, D. et al.: A paracrine loop in the vascular endothelial growth factor pathway triggers tumor angiogenesis and growth in multiple myeloma. Haematologica, 88, 2003, s. 176–185.

Doc. MUDr. Martin Tichý, CSc.
 Ústav patologie LF UP a FNOL
 Hněvotínská 3
 775 15 Olomouc
 tel.: 585 632 453
 E-mail: tichym@tunw.upol.cz

NABÍDKA ČASOPISŮ ČLS JEP V ROCE 2010

ČASOPIS	PERIOD.	CENA/ČÍSLO Kč	PŘEDPLATNÉ Kč	CENA/ČÍSLO SR €	PŘEDPLATNÉ SR €
Acta chirurgiae plasticae	4 x	120,-	480,-	6,60	26,40
Anesteziologie a intenzivní medicína	6 x	100,-	600,-	6,90	41,40
Časopis lékařů českých	12 x	102,-	1224,-	4,95	59,40
Česká a slovenská farmacie	6 x	150,-	900,-	6,60	39,60
Česká a slovenská oftalmologie	6 x	71,-	426,-	5,50	33,-
Česká gynekologie	6 x	110,-	660,-	6,60	39,60
Česká revmatologie	4 x	110,-	440,-	6,60	26,40
Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství	6 x	93,-	558,-	4,70	28,20
Česko-slovenská dermatologie	6 x	195,-	1170,-	7,00	42,-
Česko-slovenská patologie a Soudní lékařství	4 x	131,-	524,-	4,80	19,20
Česko-slovenská pediatrie	12 x	86,-	1032,-	4,30	51,60
Epidemiologie, mikrobiologie, imunologie	4 x	125,-	500,-	5,90	23,60
Otorinolaryngologie a foniatrie	4 x	110,-	440,-	6,80	27,20
Pracovní lékařství	4 x	130,-	520,-	6,70	26,80
Praktický lékař	12 x	75,-	900,-	4,30	51,60
Rehabilitace a fyzikální lékařství	4 x	97,-	388,-	4,20	16,80
Rozhledy v chirurgii	12 x	98,-	1176,-	4,20	50,40
Transfúze a hematologie dnes	4 x	70,-	280,-	4,20	16,80
Revizní a posudkové lékařství	4 x	125,-	500,-	4,10	16,40

STUDENTI (je nutné doložit potvrzení o studiu):

ČASOPIS	PERIOD.	CENA/ČÍSLO Kč	PŘEDPLATNÉ Kč	CENA/ČÍSLO €	PŘEDPLATNÉ €
Česká stomatologie a Praktické zubní lékařství	6 x	47,-	282,-	2,40	14,40
Česko-slovenská pediatrie	12 x	44,-	528,-	2,20	26,40
Praktický lékař	12 x	38,-	456,-	2,20	26,40

Objednávky zasílejte na adresu:

Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2
 tel./fax: 224 266 226, 296181805, e-mail: nts@cls.cz, spalova@cls.cz
 inzertní oddělení: tel./fax 224266265, 224266252, email: ntsinzerce@cls.cz