

## Asociácia HLA-DR a -DQ aliel s pemphigus vulgaris v slovenskej populácii

Párnická Z.<sup>1</sup>, Rakovan N.<sup>2</sup>, Švecová D.<sup>2</sup>, Buc M.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Imunologický ústav LFUK, Bratislava,  
prednosta prof. MUDr. Milan Buc, DrSc.

<sup>2</sup> Dermatovenerologická klinika LFUK, Bratislava  
prednosta prof. MUDr. Mária Šimaljaková, PhD.

### Súhrn

#### Asociácia HLA-DR a -DQ aliel s pemphigus vulgaris v slovenskej populácii

*Pemphigus vulgaris* (PV) je autoimunitná choroba, ktorá sa spája s genetickou predispozíciou, na ktorej sa najväčšou mierou podieľajú gény HLA-komplexu. Cieľom našej práce bolo zistiť, či táto choroba v slovenskej populácii, podobne ako je tomu v iných kaukazoidných populáciách, je tiež asociovaná s alelami HLA-komplexu. V súbore 32 pacientov s PV sme stanovili frekvencie HLA-DRB1 a -DQB1 aliel a porovnávali so zdravou populáciou. Zistili sme štatisticky významnú pozitívnu asociáciu s alelami DRB1\*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, Pc < 0,001) a DRB1\*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, Pc < 0,001). Alely DQB1\*03 a DQB1\*05 sa vyskytovali častejšie tiež, ale významnú úroveň nedosiahli. Frekvencia alely DQB1\*06 bola u pacientov s PV, v porovnaní s kontrolnou skupinou, významne nižšia (3,12 % vs. 20,61 %; OR = 0,12, Pc = 0,002). Nižšie, ale štatisticky nesignifikantné, alelové frekvencie sme zaznamenali tiež pri DRB1\*11 a DRB1\*15. Uvedené výsledky sú v súlade s údajmi uvádzanými v literatúre a prispievajú tak k celkovej genetickej charakteristike choroby.

**Kľúčové slová:** pemphigus vulgaris – HLA a choroby – slovenská populácia

### Summary

#### Association of HLA-DR and -DQ Alleles with Pemphigus Vulgaris in Slovak Population

*Pemphigus vulgaris* (PV) is an autoimmune disease with genetic predisposition associated mostly with HLA complex alleles. We examined whether this holds true for Slovak population similarly to other Caucasian populations. In 32 patients the frequency of HLA-DRB1 and DQB1 alleles was examined and compared to healthy population. The statistically significant positive association with alleles DRB1\*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, Pc < 0,001) and DRB1\*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, Pc < 0,001) was found. DQB1\*03 and DQB1\*05 alleles were more frequent but not on a significant level. DQB1\*06 were significantly lower in PV patients in comparison with control group (3,12 % vs. 20,61 %; OR = 0,12, Pc = 0,002). Lower, statistically non-significant frequency was noted for DRB1\*11 and DRB1\*15 alleles. These results correspond well with the literature and help to overall genetic characteristics of the disease.

**Key words:** pemphigus vulgaris – HLA complex and diseases – Slovak population

### ÚVOD

Pemphigus je označenie pre skupinu chorôb, ktoré sa vyznačujú pluzgierovými prejavmi na koži a slizniciach. Patria sem tri príbuzné choroby – *pemphigus vulgaris*, *pemphigus foliaceus* a paraneoplastický pemfigus.

*Pemphigus vulgaris* (PV) je najťažšia forma pemfigu

a pred érou používania systémovej glukokortikoidovej terapie bol skoro vždy fatálny. Klinicky sa manifestuje tvorbou vezikúl na koži a slizniciach. Príčinou vytvárania pluzgierových prejavov sú protilátky, ktoré sú namierené proti intercelulárnym adhezívnym molekulám, konkrétne proti desmogleínu 3 a desmogleínu 1 (Dsg3 a Dsg1). Okrem anti-Dsg3 a anti-Dsg1 protilátok sa na imunopatogenéze choroby podieľajú aj iné protilátky,

### Podakovanie

Práca vznikla na základe finančnej podpory pri riešení grantu MŠ SR VEGA č. 1/0145/09 a APVV č. SK-CZ 0015-07

najmä proti acetylcholinovému receptoru  $\alpha 9$  a pemfaxínu (anexín 31) (13). Tieto receptory sa podieľajú na regulácii koncentrácie intracelulárneho  $Ca^{2+}$  iónu, ktorý je nevyhnutný pre polymerizáciu aktínu, deju, ktorý sa odohráva pri spájaní sa keratinocyty s keratinocytom; vytváranie desmozómov nasleduje až po vytvorení ich stabilného kontaktu (5, 17).

*Pemphigus vulgaris* patrí medzi autoimunitné choroby, o ktorých je známe, že sa vyvíjajú na genetickom pozadí. Každá autoimunitná choroba je podmienená viacerými génmi, ide v podstate o súbor génov, z ktorých každý svojim dielom prispieva ku genetickej predispozícii, ktorá sa realizuje pod vplyvom určitého environmetálneho vyvolávateľa. V rámci genetickej predispozície medzi gény, ktoré sú najvýznamnejšie patria gény HLA-komplexu; ich podiel je až 30–40 % (2, 8, 10). Asociácie medzi HLA-alelami, resp. molekulami a chorobami sú už dobre známe a mnohé z nich sa už využívajú aj pre účely klinickej praxe. HLA-alely sa podieľajú aj na predispozícii k PV ako o tom svedčia početné údaje z literatúry, avšak nie slovenskej. Cieľom našej práce bolo preto zistiť asociáciu PV s alelami HLA-komplexu na vzorke pacientov slovenskej populácie.

## MATERIÁL A METÓDY

Súbor chorých s *pemphigus vulgaris* tvorilo 32 nepríbuzných pacientov kaukazoidnej populácie, ktorí pochádzali z viacerých oblastí Slovenska. Vek pacientov bol v priemere 56 rokov, najmladší bol 23-ročný a najstarší 83-ročný, pomer žien a mužov v sledovanom súbore bol 1,6 : 1; priemerný vek prvých prejavov choroby bol 47 rokov. Diagnóza sa určila na základe histologického vyšetrenia a u 20 pacientov sa potvrdila aj priamym imunoflu-

orescenčným vyšetrením. Kontrolnú populáciu tvorilo 130 (pre určenie HLA-DRB1 aliel), resp. 143 (pre určenie HLA-DQB1 aliel) nepríbuzných dobrovoľných jedincov kaukazoidnej populácie, ktorých sme na našom pracovisku vyšetřili v rámci populačno-genetickej štúdie (4). Aj pacienti aj zdraví dobrovoľníci sa vyšetřili tou istou metódou a primermi, ktoré pochádzali od tej istej firmy.

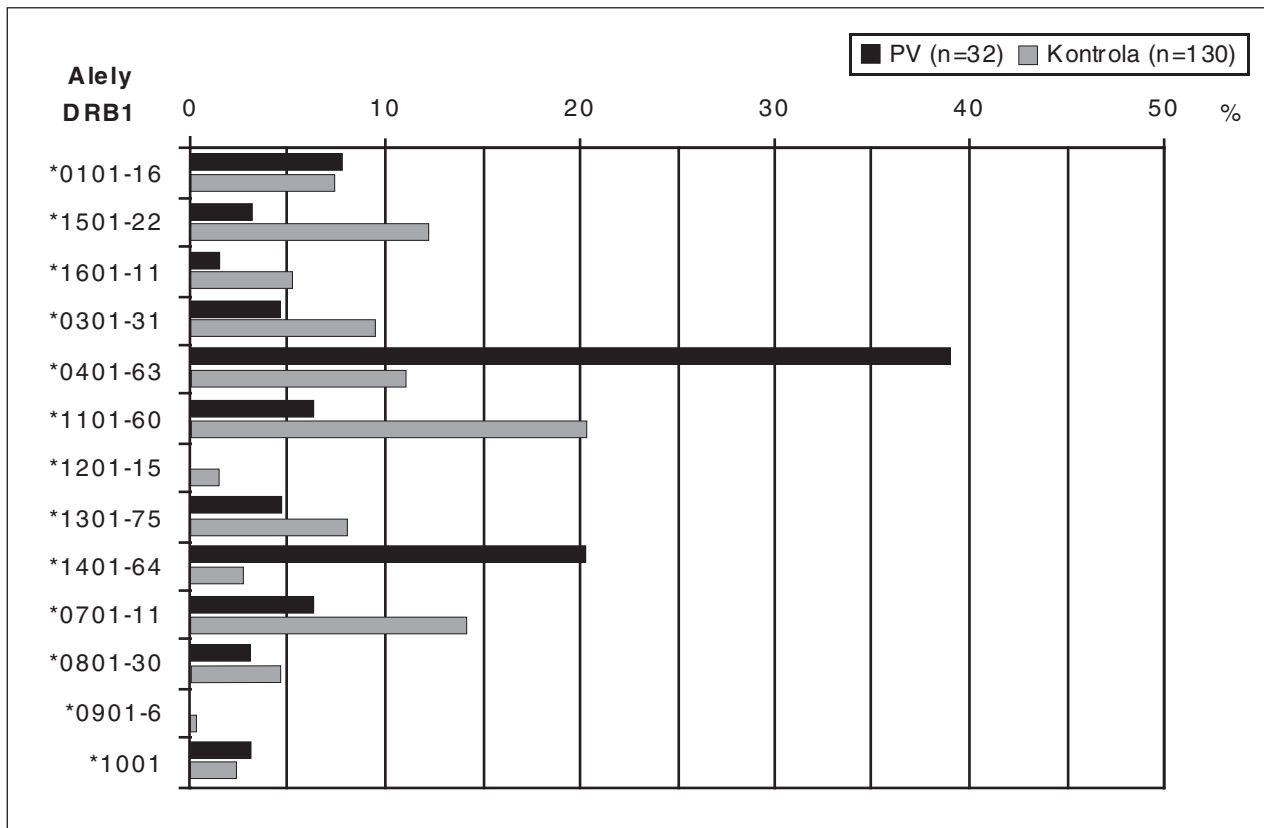
Typizáciu HLA-aliel triedy II sme robili pomocou techniky PCR-SSP (polymerázová reťazová reakcia so sekvenčne špecifickými primermi). Táto technika zahŕňa izoláciu genómovej DNA, amplifikáciu 2., príp. 2. a 3. exónu príslušnej alely a napokon vizualizáciu. Amplifikáciu polymorfnej oblasti HLA-génov sme uskutočňovali pomocou komerčne dostupných sekvenčne špecifických primerov Olerup SSP™ (Švédsko) pre nízko-rozlišovaciu (low resolution) techniku (14, 15); používali sme 23 HLA-DR párov a 8 HLA-DQ párov primerov. Nízko-rozlišovacia technika umožňuje určovať len skupinu príbuzných aliel, ale nie jednotlivé alely; napr. určovali sme DRB1\*01 skupinu, ktorá v čase získavania výsledkov zahŕňala až 16 aliel (tieto sa dajú identifikovať vysokorozlišovacou technikou – „high resolution“).

Štatistickú analýzu rozdielov medzi frekvenciami jednotlivých aliel sme v oboch súboroch robili pomocou Fisherovho exaktného testu (štatistický počítačový program INSTAT 3, GraphPad Software Inc. San Diego, CA, USA). Vypočítali sme hodnotu P, ktorá udáva pravdepodobnosť platnosti nulovej hypotézy predpokladajúcej, že medzi vyšetřovanou chorobou a znakom (alelou) neexistuje nijaká asociácia. Za hranicu štatistickej významnosti sa považuje  $P = 0,05$ . Táto hodnota sa zvykne korigovať podľa Bonferoniho ( $P_c$ ), teda vynásobením čísla P počtom aliel, resp. skupín aliel, ktoré na danom lokuse možno určiť (3). V tabuľkách uvádzame aj hodnoty pravdepodobnosti  $P_c$  (hranicou štatistickej významnosti je  $P_c = 0,05$ ). Pomer šancí (odds ratio – OR) sme vypočítali pomocou rovnaké-

Tab. 1. Frekvencie HLA-DRB1 aliel u pacientov s *pemphigus vulgaris* a u zdravých osôb

| HLA-DRB1 | PV<br>(N- 32) |       | Kontrola<br>(N - 130) |       | P        | $P_c$   | OR     | 95% CI       |
|----------|---------------|-------|-----------------------|-------|----------|---------|--------|--------------|
|          | Počet         | %     | Počet                 | %     |          |         |        |              |
| *0101-16 | 5/64          | 7,81  | 19/260                | 7,31  | 0,796    | n.s.    | 1,075  | 0,39 - 3,00  |
| *1501-22 | 2/64          | 3,12  | 32/260                | 12,31 | 0,0245   | n.s.    | 0,2227 | 0,05 - 0,95  |
| *1601-11 | 1/64          | 1,56  | 14/260                | 5,38  | 0,3193   | n.s.    | 0,279  | 0,04 - 2,16  |
| *0301-31 | 3/64          | 4,69  | 25/260                | 9,62  | 0,3191   | n.s.    | 0,4623 | 0,14 - 1,58  |
| *0401-63 | 25/64         | 39,06 | 29/260                | 11,16 | < 0,0001 | < 0,001 | 5,106  | 2,71 - 9,62  |
| *1101-60 | 4/64          | 6,25  | 53/260                | 20,38 | 0,0058   | n.s.    | 0,2520 | 0,09 - 0,72  |
| *1201-15 | 0/64          | 0,00  | 4/260                 | 1,53  | 1,00     | n.s.    | 0,4419 | 0,02 - 8,32  |
| *1301-75 | 3/64          | 4,69  | 21/260                | 8,07  | 0,436    | n.s.    | 0,5597 | 0,16 - 1,94  |
| *1401-64 | 13/64         | 20,31 | 7/260                 | 2,69  | < 0,0001 | < 0,001 | 9,213  | 3,50 - 24,23 |
| *0701-11 | 4/64          | 6,25  | 37/260                | 14,23 | 0,215    | n.s.    | 0,4018 | 0,14 - 1,17  |
| *0801-30 | 2/64          | 3,12  | 12/260                | 4,62  | 1,00     | n.s.    | 0,6667 | 0,14 - 3,06  |
| *0901-6  | 0/64          | 0,00  | 1/260                 | 0,38  | 1,00     | n.s.    | 1,341  | 0,05 - 33,33 |
| *1001    | 2/64          | 3,12  | 6/260                 | 2,31  | 0,659    | n.s.    | 1,366  | 0,27 - 6,92  |

Legenda:  $P_c$  – korigovaná P-hodnota, OR – pomer šancí (odds ratio), CI – interval spoľahlivosti (confidence interval), N – počet členov súboru, počet - zastúpenie daných aliel v súbore, % – percentuálne zastúpenie daných aliel v súbore, n.s. – hodnota nebola štatisticky významná



Obr. 1. Porovnanie frekvencie HLA-DRB1-aliel u chorých s pemphigus vulgaris so zdravou populáciou.

ho počítačového programu InStat. OR vyjadruje silu štatisticky významnej asociácie - čím je asociácia silnejšia, tým je OR vyššie ako 1; naopak, čím OR je menšie ako 1, tým silnejšia je negatívna asociácia.

## VÝSLEDKY

V súbore pacientov sme určovali 13 skupín HLA-DRB1 aliel. Ich alelová frekvencia sa pohybovala od 0,00 % až po 39,06 % (tab. 1, obr. 1). Oproti kontrolnej skupine štatisticky veľmi významne zvýšenú frekvenciu mali alely DRB1\*04 (39,06 % vs. 11,16 %, OR = 5,1, P < 0,0001, Pc < 0,001) a DRB1\*14 (20,31 % vs. 2,69 %, OR = 9,2, P < 0,0001, Pc < 0,001). Naopak, zníženú frekvenciu mali ale-

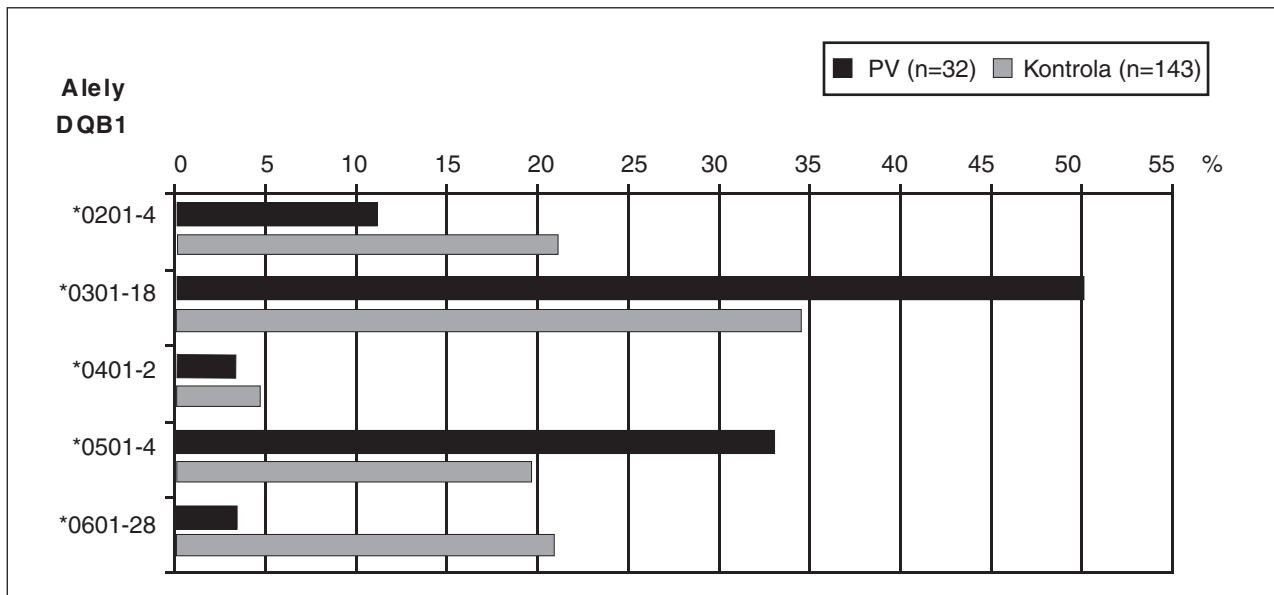
ly DRB1\*15 (3,12 % vs. 12,31 %, OR = 0,2, P = 0,024, Pc = 0,318) a DRB1\*11 (6,25 % vs. 20,38 %, OR = 0,25, P = 0,0058, Pc = 0,0754), ale tieto rozdiely neboli štatisticky významné.

Frekvencie HLA-DQB1 aliel u pacientov s PV, v porovnaní so zdravými, uvádzame v tabuľke 2 a na obrázku 2; pohybovali sa od 3,12 % až po 50,00 %. Štatisticky významne zvýšený výskyt sme pozorovali pri alelách DQB1\*03 a DQB1\*05, avšak po korekcii podľa Bonferoniho Pc nedosahovali úroveň 0,05 (DQB1\*03 = 50,00 % vs. 34,26 %; OR = 1,9, P = 0,022, Pc = 0,1105 a DQB1\*05 = 32,81 % vs. 19,58 %; OR = 2,0, P = 0,029, Pc = 0,146). Na druhej strane sme u pacientov, oproti kontrolnej skupine, zaznamenali znížený výskyt aliely DQB1\*06; štatistická významnosť nálezu zostala zachovaná aj po korekcii (3,12 % vs. 20,63 %; OR = 0,12, P =

Tab. 2. Frekvencie aliel HLA-DQB1 u pacientov s pemphigus vulgaris a zdravých osôb

| HLA-DQB1 | PV (N- 32)  |       | Kontrola (N- 143) |       | P      | P <sub>c</sub> | OR     | 95 % CI     |
|----------|-------------|-------|-------------------|-------|--------|----------------|--------|-------------|
|          | Počet aliel | %     | Počet aliel       | %     |        |                |        |             |
| *0201-4  | 7/64        | 10,94 | 60/286            | 20,98 | 0,078  | n.s.           | 0,4626 | 0,2 - 1,07  |
| *0301-18 | 32/64       | 50,00 | 98/286            | 34,26 | 0,0221 | n.s.           | 1,918  | 1,11 - 3,17 |
| *0401-2  | 2/64        | 3,12  | 13/286            | 04,55 | 1,0000 | n.s.           | 0,6774 | 0,15 - 3,08 |
| *0501-4  | 21/64       | 32,81 | 56/286            | 19,58 | 0,0292 | n.s.           | 2,006  | 1,10 - 3,65 |
| *0601-28 | 2/64        | 3,12  | 59/286            | 20,63 | 0,0004 | 0,002          | 0,1241 | 0,02 - 0,52 |

Legenda: P<sub>c</sub> – korigovaná P-hodnota, OR – pomer šancí (odds ratio), CI – interval spoľahlivosti (confidence interval), N – počet členov súboru, % – percentuálne zastúpenie daných aliel v súbore, n.s. – hodnota nebola štatisticky významná



Obr. 2. Porovnanie frekvencie HLA-DQB1-aliel u chorých s pemphigus vulgaris so zdravou populáciou.

0,0004,  $P_c = 0,002$ ). Znížená, aj keď nie signifikantne, bola aj alela DQB1\*02 (10,94 % vs. 20,98 %; OR = 0,46,  $P = 0,078$ ,  $P_c = 0,390$ ).

## DISKUSIA

*Pemphigus vulgaris* (PV) je autoimunitná choroba, ktorej nástup a progresia závisí od interakcie viacerých známych aj neznámych faktorov. Patria medzi ne lieky, strava, UV žiarenie, vírusy a iné faktory, pričom chorobné procesy vyvolávajú či podporujú iba u jedincov, ktorí majú pre danú chorobu genetickú predispozíciu (1, 2, 6, 18).

Na genetickej predispozícii PV sa najväčšou mierou podieľajú gény HLA-komplexu, ktoré sa považujú za dominujúce predipozičné genetické faktory; z nich sú to najmä HLA-DR alely, ktoré kódujú molekuly schopné, v porovnaní s inými HLA-molekulami, najúčinnnejšie indukovať (auto)imunitné procesy (2, 5, 16). PV sa vyskytuje častejšie u osôb židovského pôvodu s genetickými základmi Ashkenáziho kmeňa (4 až 10-krát častejšie ako v kaukazoidnej populácii), a preto prvé asociácie medzi HLA-systémom a PV sa hľadali práve u nich. Tieto štúdie odhalili asociáciu choroby s molekulou HLA-DR4; neskôr sa asociácia potvrdila DNA-typizáciou a navyše sa asociácia spresnila – ide o asociáciu s alelou HLA-DRB1\*0402. Podobné štúdie v kaukazoidnej a v iných populáciách tiež zistili asociáciu s HLA-DR4 a -DQ5 (kóduje ju alela HLA-DQB1\*0503) (9, 6, 11). HLA-DQB1\*0503 je vo väzbovej nerovnováhe s alelami zo skupiny DRB1\*14. Vyšetrenie chorých s PV súčasne odhalilo, že títo nemali molekulu HLA-DR3 (9, 11, 12), takže by mohla pôsobiť ako protektívny faktor.

Problematike asociácie medzi HLA-alelami a PV sa na Slovensku zatiaľ nikto nevenoval, čo nás viedlo, k tomu, aby sme takúto štúdiu urobili. Zistili sme silnú, štatisticky preukázanú, pozitívnu asociáciu *pemphigus vulgaris* s alelami DRB1\*14 a DRB1\*04. Alely DQB1\*03 a DQB1\*05 sa vyskytovali síce tiež častejšie, ale odchýlka ich frekvencie od zdravej populácie po korekcii nedosiahla signifikantnú úroveň. Na druhej strane frekvencia alielu DQB1\*06 u pacientov, v porovnaní s kontrolnou skupinou, bola signifikantne nižšia, takže môže mať protektívny charakter vzhľadom na vývoj PV. Nižšie frekvencie sme zaznamenali tiež u DRB1\*11 a DRB1\*15, ale tento nález nebol štatisticky signifikantný.

Pozitívna asociácia DRB1\*04 a DRB1\*14 alielu s PV, ktorú sme zistili v našej štúdiu, sa zistila aj v iných populáciách, napr. u Španielov, Francúzov, Talianov a iných (7, 11, 12), takže našimi výsledkami sme iba potvrdili všeobecne platnú asociáciu medzi týmito alelami a PV. Podobne negatívne asociácie alielu DQB1\*06, HLA-DRB1\*11 a HLA-DRB1\*15 s *pemphigus vulgaris*, ktoré sme pozorovali v našej štúdiu, udávajú aj iní autori (1, 6, 9). Na druhej strane sme nepotvrdili negatívnu asociáciu medzi PV a HLA-DRB1\*03, ktorá kóduje molekulu HLA-DR3, i keď náznak jej zníženej frekvencie tu je a je možné, že pri vyššom výšetrení väčšej skupiny pacientov, čo je dosť ťažké vzhľadom na nízku prevalenciu choroby, sa táto tendencia pretvorí do štatisticky signifikantnej podoby.

Výsledky, ktoré v práci prezentujeme, sme získali typizáciou na úrovni „low resolution“ a možno ich považovať len za predbežné. Je veľmi pravdepodobné, že pri podrobnejšej analýze vysoko-rozlišovacou technikou (high resolution), dospejeme k presnej identifikácii konkrétnej alely zodpovedajúcej za genetickú predispozíciu, čo je v programe našej ďalšej výskumnej práce.

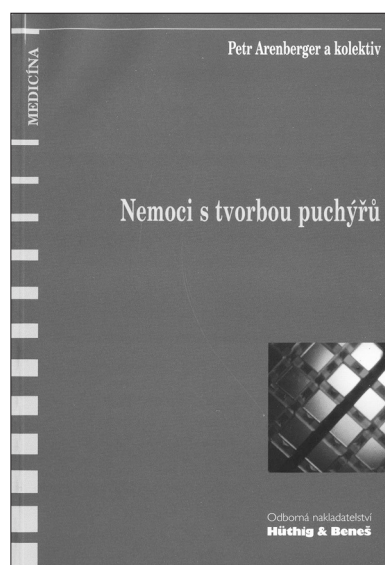
## LITERATÚRA

- BIROL, A., ANADOLU, RY., TUTKAK, H., GURGEY, E. HLA-class 1 and class 2 antigens in Turkish patients with pemphigus. *Int J Dermatol*, 2002, 41, p. 79-83.
- BUC M. *Autoimunita a autoimunitné choroby*. Bratislava: Veda 2005; 493 s.
- DUNN, OJ. Multiple comparisons among means. *Am J Statist Assoc*, 1961, 56, p. 52-64.
- FAZEKAŠOVÁ, H., SHAWKATOVÁ, I., BUC, M., FERENCÍK, S.: Frekvencia alel lokusov HLA-DRB1 a HLA-DQB1 v slovenskej populácii. *Bratisl lek Listy*, 1998, 99, 11, p. 601-604.
- FRIEDMAN A. HLA and Dermatological Disease In LECHLER, R., WARRENS A. HLA in Health and Disease. 2. vyd., Academic Press, London, 2000, p. 365-369. ISBN 0 12 440315 8.
- GLORIO, RR., RODRIGUEZ COSTA, G., HAAS, R., et al. HLA haplotypes and class II molecular alleles in Argentinian patients with pemphigus vulgaris. *J Cutan Med Surg*, 2002, 6, 5, p. 422-426.
- GONZALEL-ESCRIBANO, MF., JIMENEZ, G., WALTER, K., et al. Distribution of HLA class II alleles among Spanish patients with pemphigus vulgaris. *Tissue Antigens*, 1998, 52, p. 275.
- KREJSEK, J., KOPECKÝ O. *Klinická imunologie*. Pardubice: Nucleus, 2004, s. 302. ISBN 80-86225-50-X.
- LEE, E., LENDAS, KA., CHOW, S., et al. Disease relevant HLA class II alleles isolated by genotypic, haplotypic, and sequence analysis in North American Caucasians with pemphigus vulgaris. *Human Immunology*, 2007, 68, p. 630-643.
- LI, N., LIU, Z., HILARIO-VARGAS, J., DIAZ LA. Bullous Skin Diseases: *Pemphigus Pemphigoid*. In ROSE, NR., MACKAY, IR. *The Autoimmune Diseases*. Elsevier Academic Press, 4th Ed., 2006, p. 789-794.
- LOISEAU, P., LECLEACH, L., PROST, C., et al. HLA class II polymorphism contributes to specify desmoglein derived peptides in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus. *J Autoimmun*, 2000, 15, p. 67-73.
- LOMBARDI, ML., MERCURO, O., RUOCCO, V. et al.: Common human leucocyte antigen alleles in pemphigus vulgaris and pemphigus foliaceus Italian patients. *J Invest Dermatol*, 1999, 113, p. 107-110.
- Nguyen, VT., Assane Ndoye, A., Grado, SA. Pemphigus vulgaris antibody identifies pemphaxin. A novel keratinocyte annexin-like molecule binding acetylcholine. *J Biol Chem*, 2000, 275, p. 29466-29476.
- OLERUP, O., ALDNER, A., FODGELL, A. HLA-DQB1 and DQA1 typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours. *Tissue Antigens*, 1993, 41, s. 119-134.
- OLERUP, O., ZETTERQUIST, H. HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in 2 hours: an alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 1992, 39, 5, p. 225-235.
- SÁENZ-CANTELE, AM., FERNÁNDEZ-MESTRE, M., MONTAGNANI, S., et al. HLA-DRB1\*0402 haplotypes without DQB1\*0302 in Venezuelan patients with pemphigus vulgaris. *Tissue antigens*, 2007, 69, s. 318-325.
- ŠVECOVÁ, D. *Pemphigus*. Bratislava: Bonus, 2009, 106 s.
- TUR, E., BRENNER, S. Contributing exogenous factors in pemphigus. *Int J Dermatol*, 1997, 36, p. 888-893.

Došlo do redakcie: 20. 1. 2010

MUDr. Zuzana Párnická  
Imunologický ústav LF UK  
Odborárske nám. 14  
813 72 Bratislava I  
SR

E-mail: zuzana.parnicka@fmed.uniba.sk



## NEMOCI S TVORBOU PUCHÝŘŮ

Petr Arenberger

**Sdělovací technika, spol.s r.o. 1999, 80 str.**

**ISBN: není uvedeno**

**Cena: 72,- Kč**

**Vazba brožovaná**

### **Anotace:**

Cílem publikace je shrnutí klasických i moderních poznatků o některých chorobách s tvorbou puchýřů. Je užitečným literárním zdrojem pro postgraduální studium v dermatologii a příbuzných oborech, rozšiřujících literaturu pro studenty medicíny a pro všechny, kteří se ve své každodenní praxi s pacienty s vezikulami a bulami na kožním povrchu setkávají a jsou postaveni před otázku diferenciální diagnostiky a léčby.

Objednávky zasílejte e-mailem nebo poštou: Nakladatelské a tiskové středisko ČLS JEP, Sokolská 31, 120 26 Praha 2, fax: 224 266 226, e-mail: nts@cls.cz. Na objednávce laskavě uveďte i jméno časopisu, v němž jste se o knize dozvěděli