

Porównanie stężeń VEGF, IL-8 oraz β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika

Comparison of VEGF, IL-8 and β -FGF concentrations in the serum and ascites of patients with ovarian cancer

Sadłecki Paweł, Walentowicz-Sadłecka Małgorzata,
Szymański Wiesław, Grabiec Marek

¹ Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu, Polska

Streszczenie

Wstęp: Wśród nowotworów narządów płciowych, rak jajnika charakteryzuje się największą liczbą zgonów w stosunku do zachorowań i znajduje się na czwartym miejscu pod względem przyczyn zgonów spowodowanych rakiem u kobiet.

Inwazyjny wzrost nowotworu związany jest z pojawieniem się w guzie naczyń krwionośnych. Powstawanie unaczynienia poprawia utlenowanie komórek guza i ułatwia zaopatrywanie w substancje niezbędne do ich rozplemu. Dotychczas poznano około 30 czynników stymulujących powstawanie naczyń krwionośnych. Do czynników tych należą między innymi: VEGF, IL-8 oraz β -FGF.

Cel pracy: Celem naszych badań było porównanie stężeń VEGF, IL-8 i β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika.

Materiał i metody: W badaniu wzięto udział 21 pacjentek z rakiem jajnika leczonych operacyjnie. Stężenia VEGF, IL-8, β -FGF oznaczono metodą ELISA, zestawem odczynników Quantikine firmy R&D Systems Inc., Minneapolis, USA.

Wyniki: W płynie z jamy otrzewnej stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia VEGF, IL-8 oraz β -FGF w porównaniu do surowicy krwi.

Wnioski: Oznaczenie stężeń czynników proangiogennych w płynie z jamy otrzewnej może być przydatne w diagnostyce, prognozowaniu przebiegu i monitorowaniu leczenia pacjentek z rakiem jajnika.

Słowa kluczowe: rak jajnika / angiogeneza / VEGF, IL-8, β -FGF / wodobrzusze /

Adres do korespondencji:

Paweł Sadłecki
Katedra i Klinika Położnictwa, Chorób Kobięcych i Ginekologii Onkologicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Polska, 85-168 Bydgoszcz, ul. Ujejskiego 75
tel./fax: +48 52 36 55 242
e-mail: pawelsadlecki@wp.pl

Otrzymano: 30.03.2011
Zaakceptowano do druku: 20.06.2011

Abstract

Epithelial ovarian cancer is the leading cause of cancer death from gynecological malignancies.

Angiogenesis is considered essential for tumor growth and the development of metastases. VEGF, IL-8, β -FGF are potent angiostimulatory molecules and their expression has been demonstrated in many solid tumors, including ovarian cancer.

The aim of this study was to compare the levels of VEGF, IL-8 and β -FGF in the serum and ascites of patients with ovarian cancer. VEGF, IL-8, β -FGF concentrations were measured by ELISA (Quantikine R&D). The median VEGF, IL-8 and β -FGF levels were significantly higher in the ascites than sera of ovarian cancer patient. VEGF, IL-8, β -FGF levels in ascites might be regarded as an additional tool in the diagnosis of ovarian cancer.

Key words: **ovarian cancer / angiogenesis / VEGF, IL-8 / β -FGF / ascites /**

Wstęp

Wśród nowotworów narządów płciowych, rak jajnika wyróżnia się największą liczbą zgonów w odniesieniu do zachorowań i znajduje się na czwartym miejscu pod względem przyczyn zgonów spowodowanych rakiem u kobiet [1, 2]. Pomimo dużego postępu w medycynie, rozwoju technik operacyjnych oraz wprowadzeniu nowych sposobów leczenia chemicznego raka jajnika, odsetek przeżyć 5-letnich nie zmienił się istotnie, co jest spowodowane głównie faktem wykrywania tego nowotworu w późnych stopniach zaawansowania klinicznego [1]. Od czasu wprowadzenia oznaczeń stężeń markera Ca 125 do praktyki klinicznej, pozostaje on nadal podstawowym markerem biochemicznym raka jajnika [3, 4]. Ekspresja Ca 125 jest związana głównie z nowotworami nabłonkowymi. Wysoką czułość i swoistość markera Ca 125 obserwujemy głównie w wysokich stopniach zaawansowania klinicznego choroby, szczególnie u kobiet po menopauzie, natomiast we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego jest ona zdecydowanie niższa [4]. W związku z powyższym, trwają poszukiwania dodatkowych czynników, które zwiększyłyby odsetek wykrytych raków jajnika we wczesnych stopniach zaawansowania klinicznego oraz umożliwiłyby lepsze monitorowanie przebiegu choroby.

Inwazyjny wzrost nowotworu związany jest z pojawieniem się w guzie naczyń krwionośnych. Powstawanie unaczynienia poprawia utlenowanie komórek guza i ułatwia zaopatrzenie w substancje niezbędne do ich rozplemu [5, 6]. Dotychczas poznano około 30 czynników o działaniu stymulującym angiogenezę. Poza bezpośrednim wpływem na poszczególne etapy angiogenezy, czynniki te mogą pobudzać ekspresję innych substancji proangiogennych lub aktywować je dzięki właściwościom proteolitycznym [7]. Do czynników tych należą między innymi: czynnik wzrostu śródbłonna naczyniowego (VEGF), interleukina 8 (IL-8) oraz zasadowy czynnik wzrostu fibroblastów (β -FGF) [8]. VEGF jest silnym i wysoce selektywnym mitogenem stymulującym komórki śródbłonna naczyniowego [7]. VEGF należy do grupy czynników wzrostu wiążących się z heparyną, wraz z czynnikiem wzrostu płytek, płytkopochodnym czynnikiem wzrostu, czynnikiem wzrostu łożyska i czynnikami wzrostu fibroblastów [9]. Konstytutywną ekspresję genu VEGF w prawidłowej tkance jajnikowej oraz raku jajnika po raz pierwszy wykazał Olson w 1994 roku. Kolejni badacze udowodnili, że zwiększona ekspresja VEGF w tkance nowotworowej, koreluje z gorszym rokowaniem w wielu nowotworach złośliwych, w tym również w raku jajnika [10]. IL-8 wpływa na proliferację

komórek nowotworowych oraz bierze udział w angiogenezie [7]. Działanie proangiogenne IL-8 polega na indukcji migracji i proliferacji komórek śródbłonna naczyniowego, fibroblastów oraz zwiększaniu sekrecji czynników proangiogennych np. VEGF [11]. Stężenia interleukiny-8 w surowicy krwi są wyższe u pacjentek z rakiem jajnika, niż u kobiet zdrowych. Postuluje się, iż oznaczanie poziomów IL-8 może stanowić istotny marker w raku jajnika [12]. Czynnikiem wzrostu fibroblastów (FGF) odkryto w 1974 roku jako czynnik mający mitogenne działanie na kolonie fibroblastów. Wykazano także, że FGF ma działanie proangiogenne w rozwoju nowotworów poprzez stymulację niekontrolowanej i patologicznej angiogenezy [7]. W powstawaniu naczyń, największe znaczenie przypisuje się zasadowemu czynnikowi wzrostu fibroblastów (β -FGF), który jest zaliczany do silnych stymulatorów angiogenezy, także w nowotworach jajnika [13]. Stwierdzono również, że FGF wykazuje działanie synergistyczne z VEGF w procesie tworzenia naczyń zarówno w warunkach *in vivo* jak i *in vitro* [14].

Cel pracy

Celem naszych badań było porównanie stężeń VEGF, IL-8 i β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika.

Materiał i metodyka

W badaniu wzięło udział 21 pacjentek z rakiem jajnika leczonych operacyjnie w Katedrze i Klinice Położnictwa, Chorób Kobietych i Ginekologii Onkologicznej Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu w latach 2005-2007.

U pacjentek z podejrzanymi onkologicznie guzami jajnika w dniu poprzedzającym zabieg operacyjny pobierano 10 ml krwi z żyły łokciowej. Po około 30 minutach od pobrania krew została odwirowana (1000 obrotów/min. przez 15 minut). U pacjentek z rakiem jajnika, u których śródoperacyjnie stwierdzono obecność płynu w jamie otrzewnej, pobierano 10ml płynu, który następnie odwirowano (1000 obrotów/min. przez 15 minut). Surowicę oraz płyn z jamy otrzewnej zamrażano w temperaturze -70°C do czasu wykonania oznaczeń. Stężenia VEGF, IL-8, β -FGF oznaczono metodą ELISA, zestawem odczynników Quantikine firmy R&D Systems Inc., Minneapolis, USA. Wartości referencyjne w surowicy: VEGF - 62 – 707pg/ml, IL-8 poniżej 31,2pg/ml, β -FGF 86-124%. Pomiaru dokonano przy użyciu aparatu Labsystems Multiskan RC.

Porównanie stężeń VEGF, IL-8 oraz β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika

Analizę statystyczną wykonano przy użyciu programu komputerowego Statistica for Windows firmy StatSoft®. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Collegium Medicum w Bydgoszczy, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu – KB/522/2004. Praca była finansowana z grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego 2 P05E 088 30. Wszystkie pacjentki wyraziły świadomą zgodę na uczestnictwo w badaniu.

Wyniki

Porównano stężenia czynników proangiogennych w surowicy krwi oraz w płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika. W płynie z jamy otrzewnej stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia VEGF, IL-8 oraz β -FGF w porównaniu do surowicy krwi.

Wyniki przedstawiono w tabeli I oraz na rycinach 1-3.

Dyskusja

Powstawanie i rozwój sieci naczyń krwionośnych w guzach nowotworowych jest złożonym procesem, który od wielu lat stanowi przedmiot zainteresowania onkologów. Wraz z rozwojem wiedzy dotyczącej angiogenezy oraz poznania różnych czynników stymulujących i hamujących powstawanie naczyń w tkance nowotworowej, opracowano tzw. pośrednie metody oceny angiogenezy. Metody te polegają na ocenie stężenia czynników proangiogennych w płynach ustrojowych lub ich ekspresji w tkance nowotworowej.

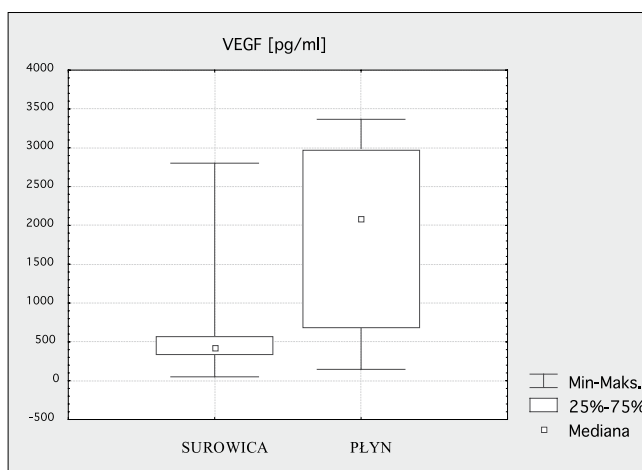
Nowotwory złośliwe jajnika stanowią jeden z najtrudniejszych problemów w ginekologii onkologicznej. Spowodowane jest to przede wszystkim trudnościami w wyodrębnieniu grupy wysokiego ryzyka, brakiem objawów we wczesnym stadium choroby oraz brakiem dostatecznie swoistej i czulej metody diagnostycznej użytecznej w masowych badaniach przesiewowych. Obecnie uważa się, że badanie kliniczne uzupełnione diagnostyką obrazową powinno być poszerzone o oznaczenie markerów nowotworowych [15].

Na podstawie wielu badań wykazano, że angiogeneza zależna od VEGF odgrywa kluczową rolę w biologii nowotworów jajnika. Przebieg kliniczny większości przypadków raka jajnika jest związany z powstawaniem dużych ilości płynu w jamie otrzewnej.

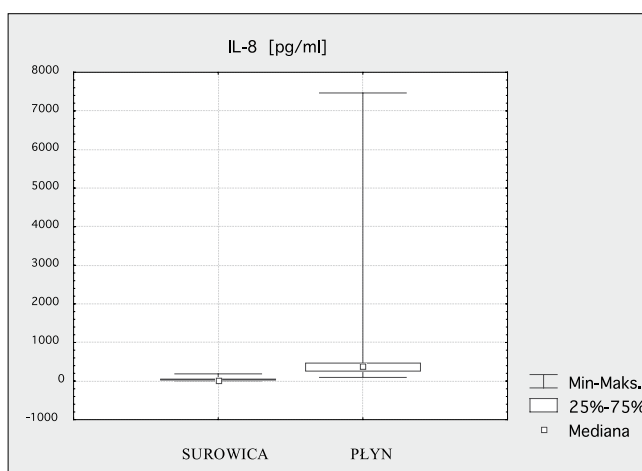
W badaniu stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia VEGF w płynie z jamy otrzewnej w porównaniu do surowicy krwi (2082,85pg/ml vs 424,5pg/ml; $p < 0,005$). Podobne wyniki uzyskał Barton porównując stężenia VEGF w surowicy krwi oraz w płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika w III i IV stopniu zaawansowania klinicznego według FIGO. W płynie z jamy otrzewnej stwierdził istotnie wyższe stężenia VEGF w porównaniu do surowicy krwi [16].

Wyższe stężenia VEGF w płynie z jamy otrzewnej w porównaniu do surowicy krwi stwierdził także Zebrowski i wsp., badając pacjentów z nowotworami złośliwymi: żołądka, jelita grubego oraz jajnika [17].

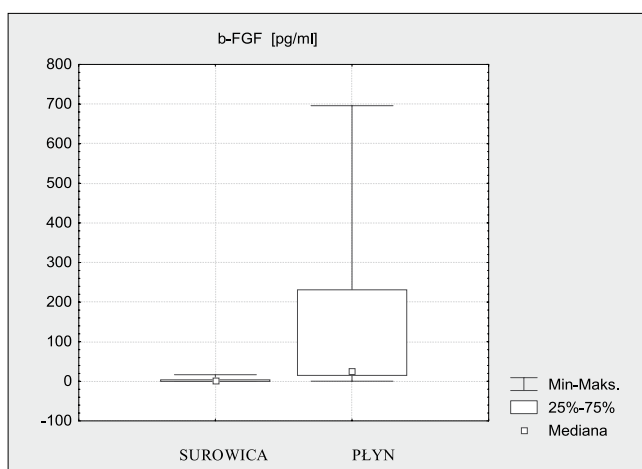
Olson i wsp. wywnioskowali, że VEGF zwiększający przepuszczalność naczyń, może być głównym czynnikiem odpowiedzialnym za powstawanie płynu w jamie otrzewnej w raku jajnika [18]. Rudłowski i wsp. stwierdzili istotnie statystycznie korelacje pomiędzy wysokimi stężeniami VEGF w płynie z jamy otrzewnej a stopniem zaawansowania klinicznego raka jajnika.



Rycina 1. Stężenia VEGF w surowicy krwi i płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 2. Stężenia IL-8 w surowicy krwi i płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika.



Rycina 3. Stężenia β -FGF w surowicy krwi i płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika.

Tabela I. Porównanie stężeń czynników proangiogennych w surowicy krwi oraz płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika (Me-mediana, Q1-pierwszy kwartyl, Q2-drugi kwartyl).

CZYNNIK PROANGIOGENNY		SUROWICA KRWI	PŁYN Z JAMY OTRZEWNEJ	P
VEGF [pg/ml]	Me	424,50	2082,85	< 0,005
	Q1	333,00	679,30	
	Q3	576,60	2971,40	
IL-8 [pg/ml]	Me	22,70	396,90	< 0,005
	Q1	16,30	253,20	
	Q3	57,40	483,30	
β-FGF [pg/ml]	Me	1,00	25,60	< 0,005
	Q1	0,00	15,10	
	Q3	3,70	230,10	

Badacze stwierdzili również, że wysokie stężenia VEGF w płynie z jamy otrzewnej negatywnie korelują z czasem przeżycia pacjentek [19].

Przedstawione powyżej dane z piśmiennictwa oraz wyniki badań własnych mogą świadczyć o tym, że VEGF może być wydzielany przez komórki nowotworowe guza bezpośrednio do jamy otrzewnej.

Ekspresję IL-8 wykazano w różnych rodzajach nowotworów złośliwych [20], Ivarsson i wsp. stwierdzili ekspresję IL-8 w nabłonku oraz zrębie raka jajnika [21]. W przeprowadzonych przez nas badaniach stwierdziliśmy istotnie statystycznie wyższe stężenia IL-8 w płynie z jamy otrzewnej w porównaniu do surowicy krwi u pacjentek z rakiem jajnika (396,9 pg/ml vs 22,70 pg/ml; $p=0,001$). Istotnie wyższe stężenia IL-8 w płynie z jamy otrzewnej w stosunku do surowicy krwi pacjentek z rakiem jajnika stwierdził również Radke i wsp. [22]. Podobną zależność wykazał również Barcz i wsp. analizując stężenia IL-8 w surowicy krwi i w płynie z jamy otrzewnej pacjentek z endometriozą [23]. Na podstawie uzyskanych danych z piśmiennictwa oraz wyników badań własnych można przypuszczać, że IL-8 jest wydzielana przez komórki nowotworowe guza bezpośrednio do jamy otrzewnej. Wysokie stężenia IL-8 w płynie z jamy otrzewnej sugerują również istotną rolę miejscowej reakcji zapalnej w przebiegu raka jajnika.

Czynniki z rodziny FGF były pierwszymi zidentyfikowanymi substancjami wpływającymi na wzrost naczyń, stwierdzono że stymulują proliferację, migrację oraz różnicowanie komórek śródbłonna. Ponadto odkryto, że guzy nowotworowe syntetyzują FGF w znacznych ilościach, co sugeruje ich istotną rolę w angiogenezie nowotworowej [24]. Obecność β-FGF stwierdzono w prawidłowej tkance jajnikowej a także w różnych nowotworach jajnika [25].

W przeprowadzonym badaniu stwierdzono istotnie statystycznie wyższe stężenia β-FGF w płynie z jamy otrzewnej w porównaniu do surowicy krwi u pacjentek z rakiem jajnika (25,6 pg/ml vs 1,0 pg/ml; $p=0,001$). Podobne wyniki uzyskał Barton analizując stężenia β-FGF w surowicy i płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika w stopniu III i IV według FIGO. Stężenia β-FGF w płynie z jamy otrzewnej były istotnie wyższe w porównaniu do obserwowanych w surowicy krwi [16]. Powyższe dane mogą potwierdzać dotychczasowe spostrzeżenia, że również β-FGF pochodzi głównie z komórek guza pierwotnego oraz przerzutów nowotworowych i jest wydzielany bezpośrednio do płynu otrzewnowego.

Wnioski

1. U pacjentek z rakiem jajnika stwierdzono obecność czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, interleukiny 8, zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów w płynie z jamy otrzewnej.
2. Wykazano, że stężenia czynnika wzrostu śródbłonna naczyniowego, interleukiny 8 i zasadowego czynnika wzrostu fibroblastów w płynie z jamy otrzewnej są istotnie wyższe w porównaniu do surowicy krwi, co może sugerować istnienie miejscowego środowiska promującego angiogenezę nowotworową.
3. Oznaczenie stężeń czynników proangiogennych w płynie z jamy otrzewnej u pacjentek z rakiem jajnika może być przydatne rokowniczo jednak konieczne jest przeprowadzenie badań obejmujących większą grupę chorych.

Porównanie stężeń VEGF, IL-8 oraz β -FGF w surowicy krwi i płynie otrzewnowym u pacjentek leczonych z powodu raka jajnika

Piśmiennictwo

1. Markowska J. Onkologia Ginekologiczna. Wrocław: *Urban & Partner*, 2002.
2. Didkowska J, Wojciechowska U, Tarkowski W, [i wsp.]. Nowotwory złośliwe w Polsce w 2000 roku. Warszawa: *Centrum Onkologii – Instytut*, 2003.
3. Bast R, Feeney M, Lazarus H, [et al.]. Reactivity of a monoclonal antibody with human ovarian carcinoma *J Clin Invest*. 1981, 68, 1331-1337.
4. Grzybowski W, Beta J, Fritz A, [i wsp.]. Wartość predykcyjna stężenia CA 125 w diagnostyce raka jajnika u kobiet przed i po menopauzie. *Ginekol Pol*. 2010, 81, 511-515.
5. Zhang Y, Tang H, Cai J, [et al.]. Ovarian cancer-associated fibroblasts contribute to epithelial ovarian carcinoma metastasis by promoting angiogenesis, lymphangiogenesis and tumor cell invasion. *Cancer Lett*. 2011, 303, 47-55.
6. Gómez-Raposo C, Mendiola M, Barriuso J, [et al.]. Angiogenesis and ovarian cancer. *Clin Transl Oncol*. 2009, 11, 564-571.
7. Bednarek W, Mazurek M, Cwiklińska A, Barczyńska B.. Expression of selected angiogenesis markers and modulators in pre-, peri- and postmenopausal women with ovarian cancer *Ginekol Pol*. 2009, 80, 93-98.
8. Bednarek W. Markers and modulators of angiogenesis in ovarian cancer. *Ginekol Pol*. 2007, 78, 754-756.
9. Norrby K. Angiogenesis: New aspects relating to its initiation and control. *APMIS*. 1997, 105, 417-437.
10. Siddiqui G, Elmasry K, Wong Te, [et al.]. Prognostic significance of intratumoral vascular endothelial growth factor as a marker of tumour angiogenesis in epithelial ovarian cancer. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2010, 31 156-159.
11. Ivarsson K, Ekeryd A, Fyhr I, [et al.]. Upregulation of interleukin-8 and polarized epithelial expression of interleukin-8 receptor A in ovarian carcinoma. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2000, 79, 777-784.
12. Lokshin A, Winans M, Landsittel D, [et al.]. Circulating IL-8 and anti-IL-8 autoantibody in patients with ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2006, 102, 244-251.
13. Li T, Jiang S. Effect of bFGF on invasion of ovarian cancer cells through the regulation of Ets-1 and urokinase-type plasminogen activator. *Pharm Biol*. 2010, 48, 161-165.
14. Tille J, Wood J, Mandriota S, [et al.]. Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther*. 2001, 299, 1073-1085.
15. Nowak M, Szpakowski M, Malinowski A, [i wsp.]. Wyniki oznaczeń badanych cytokin w surowicy chorych na raka jajnika lub łagodne torbiele jajników. *Ginekol Pol*. 2001, 72, 1444-1448.
16. Barton D, Cai A, Wendt K, [et al.]. Angiogenic protein expression in advanced ovarian cancer. *Clin Cancer Res*. 1997, 3, 1579-1586.
17. Zebrowski B, Liu W, Ramirez K, [et al.]. Markedly elevated levels of vascular endothelial growth factor in malignant ascites. *Ann Surg Oncol*. 1999, 6, 373-378.
18. Olson T, Monhanraj D, Garson L, Ramakrishnan S. Vascular permeability factor gene expression in normal and neoplastic human ovaries. *Cancer Res*. 1994, 54, 276-280.
19. Rudłowski C, Pickart A, Fuhljahn C, [et al.]. Prognostic significance of vascular endothelial growth factor expression in ovarian cancer patients: a long-term follow-up. *Int J Gynecol Cancer*. 2006, 16, 183-189.
20. Miyamoto M, Shimizu Y, Okada K, [et al.]. Effect of interleukin-8 on production of tumor-associated substances and autocrine growth of human liver and pancreatic cancer cells. *Cancer Immunol Immunother*. 1998, 47, 47-57.
21. Ivarsson K, Runesson E, Sundfeldt K, [et al.]. The chemotactic cytokines Interleukin 8 – a cyst fluid marker for malignant epithelial ovarian cancer? *Gynecol Oncol*. 1998, 71, 420-423.
22. Radke J, Schmidt D, Bohme M, [et al.]. Cytokine level in malignant ascites and peripheral blood of patients with advanced ovarian carcinoma. *Geburtshilfe Frauenheilkd*. 1996, 56, 83-87.
23. Barcz E, Rozewska E, Kaminski P, [et al.]. Angiogenic activity and IL-8 concentrations in peritoneal fluid and sera in endometriosis. *Int J Gynecol Obstet*. 2002, 79, 229-235.
24. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L, Neufeld G. Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocrine Rev*. 1987, 8, 95-114.
25. Auguste P, Javerzat S, Bilkfalvi A. Regulation of vascular development by fibroblast growth factors. *Cell Tissue Res*. 2003, 314, 157-166.

KOMUNIKAT



MAZURSKA SZKOŁA USG I GINEKOLOGII

PLANOWANE KURSY W MAZURSKIEJ SZKOLE USG
I GINEKOLOGII W 2011 ROKU

24-27.08.2011

USG w ginekologii i położnictwie dla zaawansowanych
Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

4-9.09.2011

USG w ginekologii i położnictwie dla początkujących .
Teoria i praktyka.

Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

29.9-1.10.2011

Diagnostyka dopplerowska w ginekologii i położnictwie
Kierownik naukowy: prof. dr hab. Mariusz Dubiel

6-8.10.2011

Diagnostyka prenatalna z elementami echokardiografii płodu
Kierownik naukowy: dr hab. Dariusz Borowski

13-15.10.2011

Kolposkopia dla zaawansowanych
Kierownik naukowy: prof. dr hab. Andrzej Malarewicz

23-26.11.2011

USG w ginekologii i położnictwie dla zaawansowanych
Kierownik naukowy: prof. dr hab. Romuald Dębski

Wszelkie informacje oraz zapisy na kursy:

www.usg.pisz.pl, usg@usg.pisz.pl
tel.: **0 504 075 804**

MAZURSKA SZKOŁA USG I GINEKOLOGII,
GEMELLI S.C.
UL. LEŚNA 18, 12-200 PISZ