

Received: 2012.06.11  
Accepted: 2013.05.10  
Published: 2013.07.24

## Znaczenie diagnostyczne nowego markera KIM-1 w uszkodzeniach nerek\*

### The diagnostic importance of the new marker KIM-1 in kidney damage

Zofia Marchewka, Joanna Płonka

Pracownia Markerów Nefrotoksyczności Środowiskowej, Katedra i Zakład Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu

#### Streszczenie

Rozwijające się lawinowo w ostatnich latach badania naukowe, wyłaniają nowe markery do oceny nieuchwytnego dotychczas okresu choroby przed ujawnieniem się jej skutków klinicznych. Dzięki badaniom eksperymentalnym przeprowadzonym na zwierzętach oraz z zastosowaniem linii komórkowych kanalika proksymalnego wykryto geny, które ulegają wczesnej indukcji po niedotlenieniu [1].

Produkty białkowe tych genów mogą być przydatne jako markery diagnozowania niewydolności nerek, a jednym z takich produktów indukcji genowej jest KIM-1 (kindey injury molecule-1). W pracy przedstawiono dane na temat budowy, funkcji biologicznej i znaczenia określania stężeń KIM-1 w diagnostyce uszkodzeń toksycznych oraz polekowych.

#### Słowa kluczowe:

KIM-1 • ostre uszkodzenie nerek • markery w moczu

#### Summary

In recent years, the rapid development of scientific research led to the introduction of strategies based on new markers that allow for estimation of the latent disease period before the clinical symptoms of actual kidney failure are revealed.

The experimental tests carried out on animals and cell lines derived from the proximal tubule have made possible the detection of genes that are induced early after hypoxia [1].

The protein products of these genes can be considered as useful markers for the diagnosis of renal failure. The induction of gene KIM-1 (called Kidney Injury Molecule-1) results in the formation of protein that can be considered as a diagnostic marker.

This work describes the data on the structure, biological function and importance of determining the concentrations of KIM-1 in the diagnosis of drug-induced toxicity and kidney damage.

#### Keywords:

kidney injury molecule-1 • acute renal failure • urinary markers

\*Praca naukowa w ramach działalności ST-703.

<b>Full-text PDF:</b>	<a href="http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1059673">http://www.phmd.pl/fulltxt.php?CID=1059673</a>
<b>Word count:</b>	1470
<b>Tables:</b>	–
<b>Figures:</b>	–
<b>References:</b>	32

**Adres autorki:** dr n. farm. Zofia Marchewka, Pracownia Markerów Nefrotoksyczności Środowiskowej, Katedra i Zakład Toksykologii Uniwersytetu Medycznego im. Piastów Śląskich we Wrocławiu, ul. Borowska 211, 50-556 Wrocław; e-mail: zofia.marchewka@umed.wroc.pl

## CHARAKTERYSTYKA KIM-1

KIM-1 jest transbłonową glikoproteiną typu pierwszego zawierającą w swojej zewnątrzkomórkowej części domenę immunoglobulinową i mucynową [4,9]. Ta właśnie zewnątrzkomórkowa ektodomena stanowi ilościowy marker uszkodzenia nerek. Białko ulega ekspresji na szczytowej powierzchni błony komórek kanalików proksymalnego, następnie jego zewnątrzkomórkowa domena jest odszczepiana przez metaloproteinazy i wydzielana do moczu. Jej masa cząsteczkowa wynosi 80-90 kDa. Odłączanie ektodomeny od białka KIM-1 do środowiska zewnątrzkomórkowego może być blokowane przez inhibitory metaloproteinazy (Batimastat i Ilomastat) lub przez przeciwciała wiążące się z miejscem proteolizy [2,3,9,22].

Białko KIM-1 jest niewykrywalne w zdrowej nerce, ani w moczu. W odpowiedzi na niedotlenienie lub uszkodzenie kanalików nerkowych następuje wzmożona ekspresja i zwiększona jego synteza. Wzrost jest obserwowany zwłaszcza w segmencie S3 kanalików proksymalnego, w zewnętrznej warstwie rdzenia, która jest szczególnie wrażliwa na niedokrwienie. Nie stwierdza się ekspresji białka KIM-1 w kłębuszkach, ani w komórkach rdzenia wewnętrznego [2,11].

Patomechanizm tego procesu nie został do końca poznany. Istnieją przypuszczenia, że bezpośrednim czynnikiem indukującym KIM-1 jest zwiększenie ilości całkowitego białka w filtracie kłębuszkowym oraz obecność wałeczków białkowych, które mogą powodować zwiększenie ciśnienia w kłębuszku, a także przyczyniać się do powstawania niedrożności kanalików. Białko to jednak, poprzez zdolność oddziaływania z innymi cząsteczkami białkowymi może tworzyć ochronny film na powierzchni komórek kanalików proksymalnego i dzięki temu modulować procesy związane z uszkodzeniem i naprawą [6,15,26].

## PRZYDATNOŚĆ KLINICZNA

Istnieją badania, potwierdzające ekspresję KIM-1 w cewkach, w przebiegu ogniskowego stwardnienia kłębuszków nerkowych, nefropatii IgA, czy glomerulopatii błoniasto-rozplamowej. Jest to związane z białkomoczem oraz jego skutkami (rozwój procesów zapalenia

i włóknienia kanalikowo-śródmiaższowego). Chorzy z wysokim stopniem proteinurii w wyniku przewlekłej choroby kłębuszków są bardziej narażeni na rozwój przewlekłego uszkodzenia mięszu nerek niż porównywalna grupa z niewielkim wydalaniem białka. Na tej podstawie zasugerowano, iż KIM-1 może być biomarkerem przewlekłego uszkodzenia cewek [7,22].

Szczególną przydatność KIM-1 stwierdzono w ostrym uszkodzeniu kanalików, które może być wynikiem niedotlenienia (wstrząs, rozległe zabiegi chirurgiczne na naczyniach głównych i sercu, transplantacja nerek), septycznego lub toksycznego uszkodzenia nerek (wywołanego radiokontrastem, środkami antybakteryjnymi, przeciwgrzybiczymi i cytotoksycznymi). KIM-1 pojawia się w moczu już pierwszego dnia po toksycznym lub niedokrwiennym uszkodzeniu kanalików nerkowych, podczas gdy kreatynina w osoczu wzrastała dopiero trzeciego dnia. Wzrost stężenia KIM notowano ponadto godzinę po zabiegach kardiochirurgicznych [13,14,16,28].

Potwierdzono przydatność tego białka w diagnostyce ostrej niewydolności nerek wywołanej sepsą lub towarzyszącej zabiegom kardiochirurgicznym z zastosowaniem krążenia pozaustrojowego [1,13].

Przeprowadzone badania w grupie osób z niewydolnością serca (II-IV stopień zaburzeń wg NYHA – Nowojorskie Towarzystwo Kardiologiczne), wykazały znacznie zwiększony poziom KIM-1 w moczu w stosunku do osób zdrowych [7]. KIM-1 może być czynnikiem predykcijnym funkcjonowania przeszczepu po transplantacji nerki. Timmeren i wsp. [26] udowodnili, że wraz ze wzrostem stężenia ektodomeny tego białka w moczu, zwiększa się ryzyko przewlekłego odrzucania allogenicznego przeszczepu nerki.

Istnieją badania donoszące, że KIM-1 jest wczesnym, swoistym, nieinwazyjnym markerem uszkodzenia nerek, indukowanego śmiercią mózgową dawcy tego organu [20].

Zwiększoną ekspresję KIM-1 obserwowano również w nowotworach, takich jak rak nerkowokomórkowy. Białko ulega syntezie i jest wykrywane w moczu

u 91% pacjentów z rakiem jasnokomórkowym, a także w cystach i komórkach do nich przylegających oraz u osób cierpiących na wielotorbielowatość nerek. W komórkach nowotworowych nerki białko to może zmniejszać wrodzoną odporność immunologiczną, ułatwiając rozrost guza [3,4].

### **ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE W TOKSYCZNYCH USZKODZENIACH NEREK**

Nefrotoksyczność wielu ksenobiotyków może być zarówno działaniem niepożądanym terapii, jak i narażenia środowiskowego czy ekspozycji w miejscu pracy. Cewka proksymalna, w przeciwieństwie do cewek dystalnych, ma mniej szczelną warstwę epitelialną i właśnie na tym odcinku odbywa się transport dokomórkowy większości metali ciężkich czy koniugatów glutationowych związków organicznych. Nabłonek kanalika proksymalnego jest szczególnie wrażliwy na toksyczne substancje chemiczne. Zachodzi w nim wiele zmian, tj.:

- utrata polarności i integralności cytoszkieletu,
- nekroza lub apoptoza,
- różnicowanie przetrwałych komórek nabłonkowych,
- migracja słabo zróżnicowanych komórek przez błonę podstawną,
- proliferacja przetrwałych komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego,
- różnicowanie zregenerowanych komórek nabłonkowych do postaci umożliwiającej prawidłowe funkcjonowanie cewki proksymalnej [12].

Badania przeprowadzane na szczurach, poddawanych ekspozycji na kadm, wykazały, że KIM-1 jest wczesnym markerem uszkodzenia nerek wywołanego tym metalem. Ektodomena była wykrywana w moczu 4-5 tygodni przed pojawieniem się białkomoczu i jej poziom wzrastał znacząco w miarę wydłużania okresu narażenia na kadm. Jednak swoisty związek między ekspresją KIM-1, a patofizjologicznymi zmianami w nerkach wywołanymi przez ten metal, nie są jeszcze wyjaśnione. Dowody naukowe wskazują, iż ekspresja proteiny jest częścią procesu naprawczego tkanek, po złuszczeniu się uszkodzonych komórek kanalików proksymalnych do jego światła. Rezultaty przeprowadzonych badań wykazały, że KIM-1 jest czułym markerem wczesnego stadium uszkodzenia kanalików proksymalnych indukowanego kadmem, zarówno u szczurów, ssaków naczelnych, jak i ludzi [23,24].

W badaniach Bonventre'a i wsp. [3] analizowano ekspresję białka KIM-1 w tkankach (metodą immunofluorescencji) oraz w moczu szczurów w odpowiedzi na trzy różne nefrotoksyny: tetrafluoroetylo-1-cysteinę (TFEC), kwas foliowy i cisplatynę. Mimo różnego mechanizmu uszkodzenia nerek przez wymienione toksyny, wzrost ekspresji KIM-1 obserwowano we wszystkich modelach. W odpowiedzi na intoksykację TFEC typ ekspresji tego białka był podobny do modelu występującego w uszkodzeniu niedokrwinnym nerki, w przypadku intoksykacji kwasem foliowym ekspresja KIM-1 była wyraźnie

umiejscowiona w szczytowej części komórek nabłonkowych kanalika proksymalnego, natomiast po podaniu cisplatyny ekspresja KIM-1 nastąpiła w segmencie S3 cewki bliższej. Stwierdzono również obecność ektodomeny tego białka w moczu, podczas gdy stężenie kreatyniny w osoczu zmieniło się nieznacznie.

Podobnie wyniki uzyskano w badaniach przeprowadzonych na szczurach, którym podawano inne ksenobiotyki o różnych mechanizmach nefrotoksycznego działania: gentamycynę, rtęć oraz sole chromu. Gentamycyna prowadzi do zmian strukturalnych błony komórkowej mitochondriów i lizosomów komórek nerkowych. Rtęć może reagować z grupami sulfhydrylowymi różnych cząstecek, m.in. glutationu, cysteiny, metalotioneiny, zwłaszcza w segmencie S3 nefronu. Chrom VI kumuluje się w segmentach S1 i S2 kanalika bliższego wywołując nekrozę.

We wszystkich przypadkach stwierdzono wzrost ekspresji genu KIM-1/Havcr1 i zwiększenie stężenia ektodomeny w moczu. Wzrost zależny był od zmian histopatologicznych w nerce i znacznie wyprzedzał wzrost poziomu kreatyniny w osoczu [3,5].

Wyniki eksperymentu przeprowadzonego przez Hyo-Wook Gila i wsp. [10] wykazały, że stężenie KIM-1 wzrasta również po intoksykacji parakwatem - herbicydem stosowanym na masową skalę. Reaktywne związki tlenu mogą być jednym z mediatorów ekspresji KIM-1 u pacjentów po intoksykacji parakwatem.

Prowadzone badania na szczurach z ochratoksyną A (mikotoksyną najczęściej występującą w pokarmach) wykazały, że najwcześniejszą i najbardziej widoczną reakcją na intoksykację była indukcja ekspresji mRNA KIM-1.

### **ZNACZENIE DIAGNOSTYCZNE W OCENIE NEFROTOKSYCZNOŚCI LEKÓW**

W lipcu 2008 r. Agencja do spraw Żywności i Leków (Food and Drug Administration) oraz Europejska Agencja Leków (European Medicines Agency) wyznaczyły KIM-1 jako jeden z markerów służących do określania nefrotoksyczności podczas badań nad nowymi lekami [4,9,23].

Kim-1 ulega syntezie w nefropatii wywołanej adriamycyną, co sugeruje, że białko może być wczesnym markerem kanalikowo-śródmiaższowego uszkodzenia wywołanego tym lekiem. Wykazano, że jednoczesne leczenie sirolimusem i cyklosporyną skutkuje zmniejszeniem klirensu kreatyniny i zwiększeniem ekspresji KIM-1. Podobnie przeprowadzone badania z cisplatyną wykazały iż KIM-1 jest najlepszym markerem służącym do wykrywania uszkodzenia kanalików proksymalnych tym lekiem [3,5,17].

Stwierdzono, że wankomycyna, cyklosporyna, jodowe środki kontrastowe powodują wzrost KIM-1. Ektodomena tego białka może być wskaźnikiem w niedo-

krwiennym, zależnym od angiotensyny uszkodzeniu nerek oraz nefropatii związanej ze starzeniem.

Wykazano także nadekspresję białka w ślimaku ucha szczurów, jako skutek ototoksycznego działania cisplatyny. Jest to interesujące, gdyż wiele leków wykazujących działanie ototoksyczne działa również nefrotoksycznie [3,25].

W badaniach Rouse'a i wsp. [29] przeprowadzonych na szczurach, określano przydatność różnych biomarkerów nefrotoksyczności w ocenie uszkodzenia nerek, wywołanego gentamycyną. KIM-1 wykazywał największy i najszybszy wzrost stężenia w odpowiedzi na uszkodzenie nerek. Był również jednym ze wskaźników najlepiej odzwierciedlających poprawę funkcji nerek po uszkodzeniu. Zaobserwowano spadek jego podwyższonego stężenia wraz z cofaniem się zmian histopatologicznych, co związane było z poprawą funkcji nerek.

Swoistość moczowego KIM-1 jako markera uszkodzenia nerek badano przez podanie hepatotoksycznej galaktosaminy szczurom. Spowodowało to wzrost poziomu aminotransferazy alaninowej (ALT) w surowicy, wskazujący na uszkodzenie wątroby, natomiast stężenie ektodomeny białka transbłonowego pozostało bez zmian, w porównaniu do kontroli, co potwierdza znaczną swoistość tego białka [32].

KIM-1 umożliwia odróżnienie ostrego niedokrwienego uszkodzenia nerek od przewlekłej niewydolności nerek, czy przednerkowej azotemii. W połączeniu z NGAL (ludzka neutrofilowa lipokalina) i IL-18 może stanowić szybki i swoisty wskaźnik diagnostyczny dla ostrej niewydolności nerek [8,13,18,19,21,31].

## PODSUMOWANIE

Przegląd najnowszej literatury pozwala stwierdzić, że KIM-1 to obiecujący wskaźnik, mogący wchodzić w skład pakietu diagnostycznego ostrego uszkodzenia nerek. Białko jest bardziej swoiste w stosunku do niedokrwienego i toksycznego uszkodzenia nerek. Przewlekła niewydolność nerek i infekcje w obrębie dróg moczowych w mniejszym stopniu wpływają na jego ekspresję. Jedną z zalet KIM-1, jako markera diagnostycznego, jest stabilność ektodomeny *ex vivo* w temperaturze pokojowej. Jest ona właściwie niezależna od cech fizykochemicznych moczu i nie podlega wpływowi innych substancji w nim zawartych [16,27]. Brak jest danych literaturowych, stwierdzających możliwość wykrywania ektodomeny w surowicy osób z ostrą niewydolnością nerek.

Obecne dane są niewystarczające do pełnej oceny przydatności KIM-1 jako markera diagnostycznego w przewlekłych chorobach nerek. Wysokie stężenia KIM-1 to złe rokowania dla chorych z ostrym uszkodzeniem nerek [30].

Wzrost stężenia tego białka w nerce, z jednej strony może być konsekwencją uszkodzenia kanalikowo-mięszkowego, z drugiej natomiast białko to może aktywnie wpływać na przebieg uszkodzenia, tworząc warstwę zabezpieczającą na powierzchni komórek kanalika proksymalnego. Rola proteiny w fagocytocie oraz jej prawdopodobny wpływ na modulację odpowiedzi immunologicznej, może spowodować, że samo białko będzie punktem docelowym terapii.

## PIŚMIENNICTWO

- [1] Bagshaw S.M.: Novel biomarkers for early diagnosis of acute kidney injury. *Expert Opin. Med. Diagn.*, 2008; 2: 1041-1054
- [2] Bailly V., Zhang Z., Meier W., Cate R., Sanicola M., Bonventre J.V.: Shedding of kidney injury molecule-1, a putative adhesion protein involved in renal regeneration. *J. Biol. Chem.*, 2002; 277: 39739-39748
- [3] Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a specific and sensitive biomarker of kidney injury. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.*, 2008; 241: 78-83
- [4] Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a urinary biomarker and much more. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2009; 24: 3265-3268
- [5] Bonventre J.V., Yang L.: Kidney injury molecule-1. *Curr. Opin. Crit. Care*, 2010; 16: 556-561
- [6] Chaturvedi S., Farmer T., Kapke G.F.: Assay validation for KIM-1: human urinary renal dysfunction biomarker. *Int. J. Biol. Sci.*, 2009; 5: 128-134
- [7] Comnick M., Ishani A.: Renal biomarkers of kidney injury in cardiorenal syndrome. *Curr. Heart Fail. Rep.*, 2011; 8: 99-105
- [8] Endre Z.H., Westhuyzen J.: Early detection of acute kidney injury: emerging new biomarkers. *Nephrology*, 2008; 13: 91-98
- [9] Fontanilla J., Han W.K.: Kidney injury molecule-1 as an early detection tool for acute kidney injury and other kidney diseases. *Expert Opin. Med. Diagn.*, 2011; 5: 161-173
- [10] Gil H.W., Yang J.O., Lee E.Y., Hong S.Y.: Clinical implication of urinary neutrophil gelatinase-associated lipocalin and kidney injury molecule-1 in patients with acute paraquat intoxication. *Clin. Toxicol.*, 2009; 47: 870-875
- [11] Han W.K., Bailly V., Abichandani R., Thadhani R., Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1 (KIM-1): a novel biomarker for human renal proximal tubule injury. *Kidney Int.*, 2002; 62: 237-244
- [12] Ichimura T., Hung C.C., Yang S.A., Stevens J.L., Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1: a tissue and urinary biomarker for nephrotoxicant-induced renal injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2004; 286: F552-F563
- [13] Liang X.L., Liu S.X., Chen Y.H., Yan L.J., Li H., Xuan H.J., Liang Y.Z., Shi W.: Combination of urinary kidney injury molecule-1 and interleukin-18 as early biomarker for the diagnosis and progressive assessment of acute kidney injury following cardiopulmonary bypass surgery: a prospective nested case-control study. *Biomarkers*, 2010; 15: 332-339
- [14] Liang X.L., Shi W.: Beyond early diagnosis: prognostic biomarkers for monitoring acute kidney injury. *Hong Kong J. Nephrol.*, 2010; 12: 45-49

- [15] Lisowska-Myjak B.: Białka w moczu powiązane z rozwojem przewlekłej niewydolności nerek. *Nefrol. Dial. Pol.*, 2010; 14: 145-150
- [16] Lisowska-Myjak B.: Laboratoryjne wskaźniki ostrego uszkodzenia nerek oznaczane w moczu i w surowicy. *Forum Nefrol.*, 2010; 3: 71-81
- [17] Miklaszewska M., Pietrzyk J.A., Zachwieja K., Drożdż D., Sułowicz W.: Wczesne laboratoryjne markery ostrej niewydolności nerek. *Przegl. Lek.*, 2006; 63: 81-84
- [18] Nguyen M.T., Devarajan P.: Biomarkers for the early detection of acute kidney injury. *Pediatr. Nephrol.*, 2008; 23: 2151-2157
- [19] Nickolas T.L., Barasch J., Devarajan P.: Biomarkers in acute and chronic kidney disease. *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.*, 2008; 17: 127-132
- [20] Nijboer W.N., Schuur T.A., Damman J., van Goor H., Vaidya V.S., van der Heide J.J., Leuvenink H.G., Bonventre J.V., Ploeg R.J.: Kidney injury molecule-1 is an early noninvasive indicator for donor brain death-induced injury prior to kidney transplantation. *Am. J. Transplant.*, 2009; 9: 1752-1759
- [21] Parikh C.R., Devarajan P.: New biomarkers of acute kidney injury. *Crit. Care Med.*, 2008; 36 (Suppl. 4): S159-S165
- [22] Peters H.P., Waanders F., Meijer E., van den Brand J., Steenbergen E.J., van Goor H., Wetzels J.F.: High urinary excretion of kidney injury molecule-1 is an independent predictor of end-stage renal disease in patients with IgA nephropathy. *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2011; 26: 3581-3588
- [23] Prozialeck W.C., Edwards J.R., Vaidya V.S., Bonventre J.V.: Preclinical evaluation of novel urinary biomarkers of cadmium nephrotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2009; 238: 301-305
- [24] Prozialeck W.C., Vaidya V.S., Liu J., Waalkes M.P., Edwards J.R., Lamar P.C., Bernard A.M., Dumont X., Bonventre J.V.: Kidney injury molecule-1 is an early biomarker of cadmium nephrotoxicity. *Kidney Int.*, 2007; 72: 985-993
- [25] Rees A.J., Kain R.: Kim-1/Tim-1: from biomarker to therapeutic target? *Nephrol. Dial. Transplant.*, 2008; 23: 3394-3396
- [26] Rouse R.L., Zhang J., Stewart S.R., Rosenzweig B.A., Espandiari P., Sadrieh N.K.: Comparative profile of commercially available urinary biomarkers in preclinical drug-induced kidney injury and recovery in rats. *Kidney Int.*, 2011; 79: 1186-1197.
- [27] Timmeren M.M., Bakker S.J.L., Vaidya V.S., Bailly V., Shuurs T.A., Damman J., Stegeman C.A., Bonventre J.V., van Goor H.: Tubular kidney injury molecule-1 in protein-overload nephropathy. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, 2006; 291: 456-464
- [28] Tyczynski B., Feldkamp T.: Kidney injury molecule-1 (KIM-1). Ein neuer marker für das akute nierenversagen. *Nephrologe*, 2009; 4: 532-533
- [29] Urbschat A., Obermüller N., Haferkamp A.: Biomarkers of kidney injury. *Biomarkers*, 2011; 16 (Suppl. 1): S22-S30
- [30] Vaidya V.S., Ramirez V., Ichimura T., Bobadilla N.A., Bonventre J.V.: Urinary kidney injury molecule-1: a sensitive quantitative biomarker for early detection of kidney tubular injury. *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 2006; 290: 517-529
- [31] Wasilewska A., Taranta-Janusz K., Dębek W., Zoch-Zwierz W., Kuroczycka-Saniutycz E.: KIM-1 and NGAL: new markers of obstructive nephropathy. *Pediatr. Nephrol.*, 2011; 26: 579-586
- [32] Zhou Y., Vaidya V.S., Brown R.P., Zhang J., Rosenzweig B.A., Thompson K.L., Miller T.J., Bonventre J.V., Goering P.L.: Comparison of kidney injury molecule-1 and other nephrotoxicity biomarkers in urine and kidney following acute exposure to gentamicin, mercury, and chromium. *Toxicol. Sci.*, 2008; 101: 159-170

---

Autorki deklarują brak potencjalnych konfliktów interesów.

---