

## LOKALIZÁCIA NADPH-d POZITÍVNYCH ŠTRUKTÚR V TÝMUSE ZAJACA A POTKANA

KLUCHOVÁ D., DORKO F., RYBÁROVÁ S.

### LOCALIZATION OF NADPH-d POSITIVE STRUCTURES IN THE RABBIT AND RAT THYMUSES

In order to provide a morphological basis for understanding the role of nitric oxide (NO) in the thymus, present study was designed to clarify the localization and distribution of nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase (NADP-d) activity, a marker of NO synthase in rabbit and rat thymuses. The NADPH-d histochemistry revealed a different distribution of diaphorase positive reactivity in both animal species, visible as dark blue structures.

The rabbit thymus displayed lightly stained cortex, whereas medulla was seen as a rounded complex of intensively stained cells, without sharp demarcation between them. However, unlike the rat thymus, the NADPH-d positive cells appeared to be arranged in an irregular line of dense staining at the corticomedullary junction. In the rat thymus, the NADPH-d positive nerve fibres were not evident, whereas neuronal-like plexuses were seen in the perivascular topography of the rabbit thymus. These results suggest that NO may participate in the regulation of thymic function. (*Fig. 6, Ref. 30.*)

**Key words:** histochemistry, NADPH-d, NO, thymus.

*Bratisl Lek Listy 1997; 98: 102–106*

V práci sme sa zamerali na určenie lokalizácie nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát-diaforázovej (NADPH-d) aktivity ako markera pre syntázu oxidu dusíka (nitric oxide synthase — NOS) v týmuse zajaca a potkana. Uvedené výsledky môžu poskytnúť morfológický základ pre pochopenie úlohy oxidu dusíka (nitric oxide — NO) v týmuse. NADPH-d histochemia znázorňovala tmavomodro zafarbené štruktúry a ukázala odlišnú distribúciu diaforázovo-pozitívnej reaktivity pri oboch druhoch experimentálnych zvierat.

V týmuse zajaca sme pozorovali slabosfarbenú kôru, kým dreň sa zdala ako kruhový alebo oválny komplex intenzívne zafarbených buniek, bez ostrého ohraničenia. V týmuse potkana však boli NADPH-d pozitívne štruktúry usporiadané do nepravidelných, tmavo zafarbených pruhov na rozhraní drene a kôry. Významný rozdiel bol v tom, že v týmuse potkana sme nezistili NADPH-d pozitívne nervové vlákna, ale v týmuse zajaca boli v perivaskulárnej topografii viditeľné splete vlákien podobných nervovým vláknám. Tieto výsledky dovoľujú predpokladať, že NO sa môže zúčastňovať na regulácii funkcie týmusu. (*Obr. 6, lit. 30.*)

**Kľúčové slová:** histochemia, NADPH-d, NO, týmus.

*Bratisl. lek. Listy, 98, 1997, č. 2, s. 102–106*

Nikotínamidadenín-dinukleotidfosfát-diaforázová (NADPH-d) histochemická reakcia predstavuje prenos vodíka zo substrátu, NADPH, na tetrazóliovú soľ, ktorá sa mení na nerozpustný tmavomodrý formazán (21, 25). Dôležitosť tejto reakcie nadobudla význam po nedávnom objave, že neuronálna NADPH-d je natoľko podobná syntáze oxidu dusíka (nitric oxide synthase — NOS), že môže byť identická (8, 17). NOS je enzým zodpovedný za syntézu oxidu dusíka (nitric oxide — NO) konverziou L-arginínu na citrullín. Pretože NO je plyn, voľný radikál s polčasom 5 sekúnd, môže ľahko difundovať do tkanív (18). Jeho detekcia je teda zameraná

na určovanie enzýmu NOS. Práce mnohých autorov (8, 17) potvrdzujú, že endotelialná a neuronálna forma NOS je lokalizovaná spolu s NADPH-d v tkanivách fixovaných 4 % paraformaldehydom. Vzhľadom na veľký význam NO (20) sa NADPH-d histochemická reakcia stala široko využívanou metódou pri štúdiu distribúcie štruktúr s NOS.

NO bol nedávno uznaný za nový medzibunkový „messenger“, ktorý sa priamo zúčastňuje na mnohých fyziologických dejoch (5, 9, 18). Známy je jeho vplyv na rôzne orgány v ľudskom organizme (19). NO má úlohu hlavne v troch systémoch:

1. v bielych krvinkách, kde sprostredkúva tumoricídne a baktericídne efekty (5),
2. v krvných cievach; syntetizuje sa v endotelových bunkách a relaxuje hladké svalstvo ciev (13),
3. ako neuronálna zložka s funkciou veľmi podobnou neurotransmiterom (5). NO sa považuje za neadrenergický, necholín-

gický neurotransmitter (nonadrenergic noncholinergic NANC) v centrálnom a periférnom nervovom systéme (3).

NO sprostredkúva určité autonómne funkcie v periférnom autonómnom nervovom systéme (3, 14). V našej práci sme sa zamerali na možnú prítomnosť NO v týmusoch zajaca a potkana histochemickým sledovaním NADPH-d.

### Materiál a metódy

V práci sme použili 9 králikov (Činčila) s hmotnosťou 2,5–3,0 kg a 7 potkanov (Wistar) s hmotnosťou 250–300 g oboch pohlaví. Experimentálne zvieratá sme anestetizovali pentobarbitalom (50 mg/kg, i.v.). Potom sme zvieratá usmrtili intrakardiálnou perfúziou fyziologickým roztokom a následnou perfúziou 4 % paraformaldehydom s 0,1 % glutaraldehydom v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 7,4. Roztoky boli čerstvé, pripravené tesne pred perfúziou.

Po perfúzii boli týmusy vyoperované z hrudnej dutiny a uložené v rovnakom fixatívne počas 3–4 hodiny. Nasledovalo ich umiestnenie v 30 % sacharóze v tom istom fosfátovom tlmivom roztoku cez noc pri 4 °C. Potom sme týmusy narezali na zmrazovacím mikrotóme na rezy s hrúbkou 45 µm.

Použitá histochemická reakcia na znázornenie NADPH-d aktivity bola modifikovaná podľa Scherera-Singlera (25). Podľa nej sme rezy inkubovali 1 h pri 37 °C v roztoku 1,5 mM nitroblue tetrazólia (NBT, Sigma Chemicals, N-6876), 1,0 mM β-nikotínamidadenínindinukleotidfosfátu (NADPH, Sigma Chemicals, N-1630), 10,0 mM monosodiummalátu (Malic acid, Sigma Chemicals, M-1125), 0,5 % Tritonu X-100 rozpusteného v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku, pH 8,0. Kontrolné rezy sme inkubovali takým istým spôsobom, ale bez NADPH v reakčnom roztoku. Takto sme testovali endogénnu redukčnú aktivitu podľa Hopeho a Vincenta (16).

Po inkubačnej reakcii sme rezy prepierali v 0,1 M fosfátovom tlmivom roztoku pH 7,4, montovali na sklíčka a nechali vysušiť na vzduchu cez noc. Nakoniec sme tieto rezy pokrývali Entellanom.

### Výsledky

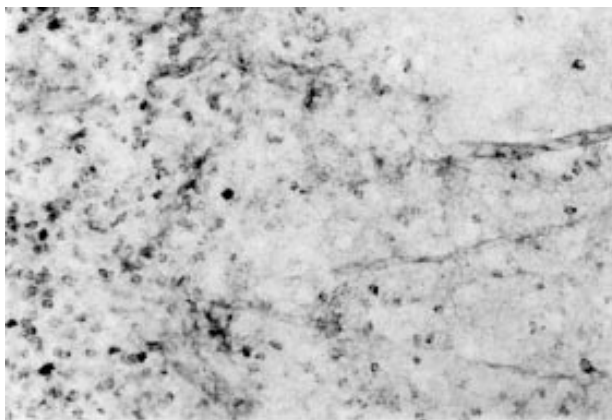
NADPH-d histochemia týmusov zajaca aj potkana ukázala odlišnú distribúciu diaforázovo-pozitívnej reaktivity v dreni a v kôre znázornenú ako tmavomodro zafarbené štruktúry.

#### Kôra

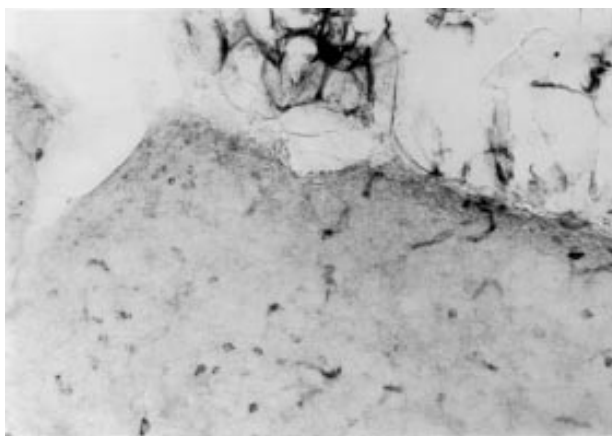
NADPH-d aktivita v kôre týmusu bola v podstate podobná u oboch experimentálnych zvierat. Diaforázovo-pozitívne sfarbenie preukazovalo len slabú intenzitu a bolo difúzne rozptýlené po celom parenchýme kôry. Viditeľnejšie boli znázornené len radiálne orientované cievy (obr. 1). Na povrchu kapsuly týmusu sa priležitostne objavili zreteľne vyznačené zhluky tukových buniek (obr. 2).

#### Dreň

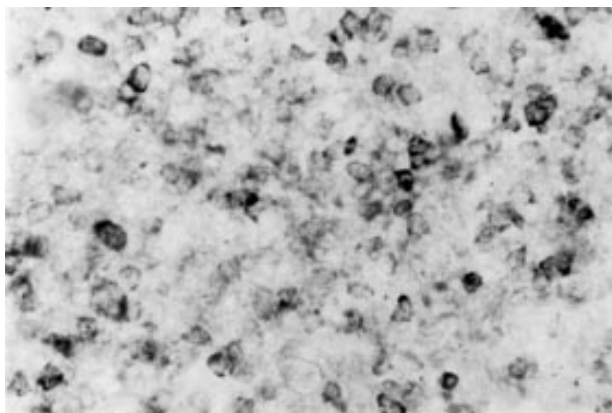
Dreň týmusu zajaca ukazovala zásadne odlišný obraz NADPH-d pozitívity v porovnaní s dreňou potkana. Už pri menšom zväčšení (12-krát) bolo možné pozorovať, že dreň zajaca sa zdala ako okrúhly komplex intenzívne sfarbených buniek, pričom korti-



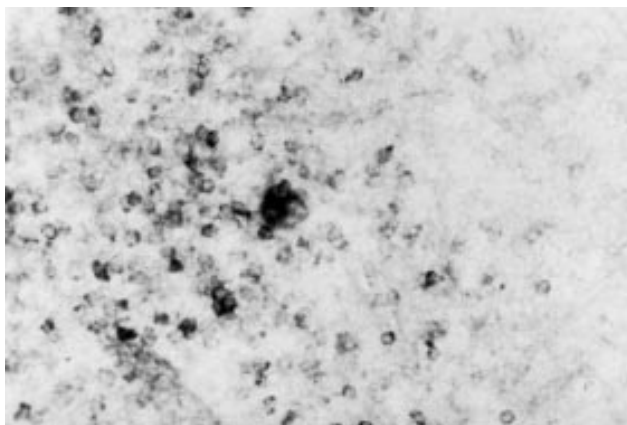
Obr. 1. Pohľad na rozhranie kôry a drene týmusu zajaca s radiálne orientovanými cievami v kôre týmusu zajaca.  
Fig. 1. View of the rabbit thymic corticomedullary junction with radially oriented blood vessels in the cortex.



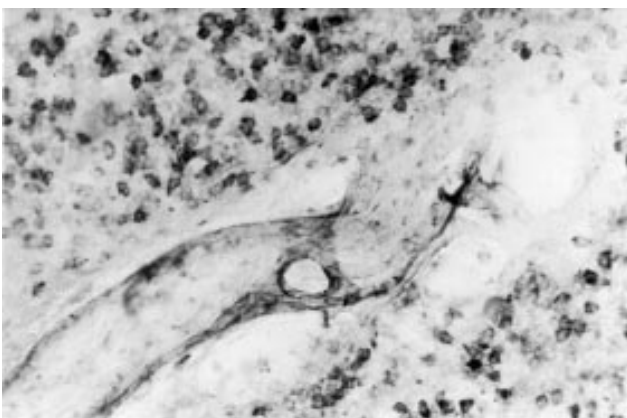
Obr. 2. NADPH-d pozitívne tukové bunky na povrchu kapsuly týmusu zajaca.  
Fig. 2. NADPH-d positive fat cells on the surface of the rabbit thymic capsule.



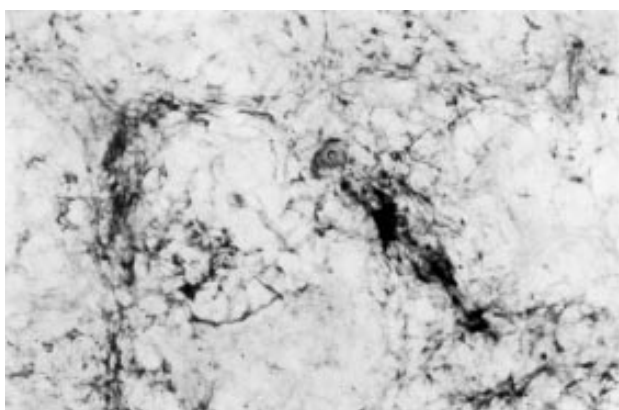
Obr. 3. Detailný pohľad na bunky drene týmusu zajaca.  
Fig. 3. Detailed view of thymic medullary cells of the rabbit.



Obr. 4. Uprostred štruktúra podobná corpusculum thymicum v dreni týmusu zajaca.  
Fig. 4. In the middle, corpusculum thymicum-like structure in the thymic medulla of the rabbit.



Obr. 5. Krvná cieva v septe v dreni týmusu zajaca.  
Fig. 5. Blood vessel in the septum of the rabbit thymic medulla.



Obr. 6. NADPH-d pozitivita na rozhraní kôry a drene v týmuse potkana.  
Fig. 6. NADPH-d positivity at the corticomedullary junction of the rat thymus.

komedulárna hranica bola nejasná, bez ostrého ohraničenia (obr. 1). NADPH-d pozitívne bunky drene mali v zásade podobný tvar, ich telá boli väčšinou oválne, okrúhle, monopolárne, bipolárne alebo multipolárne. Nepozorovali sme žiadne výraznejšie výbežky týchto buniek. Podľa intenzity ich sfarbenia možno rozdeliť tieto bunky do niekoľkých skupín (obr. 3):

— Bunky s najslabšou NADPH-d pozitivitou boli takmer nesfarbené, slabovo viditeľné bolo len ohraničenie ich tiel. Vyskytovali sa roztrúsené po celej dreni.

— Iný typ buniek preukazoval ich zreteľne marginálne NADPH-d sfarbenie. Navyše v ich cytoplazme bolo možné pozorovať NADPH-d pozitívne granuly. Jednotlivé bunky sa vzájomne líšili rôznou intenzitou sfarbenia týchto granúl. Tento typ buniek sa vyskytoval v dreni týmusu zajaca najčastejšie.

— Jedna skupina dreňových buniek ukazovala obzvlášť intenzívnu NADPH-d reakciu. Granuly v ich vnútri nebolo možné rozoznať pre vysokú denzitu sfarbenia. Tieto bunky sa vyskytovali v dreni len zriedkavo. Okrem uvedených diaforázovo-pozitívnych buniek sme v dreni príležitostne pozorovali nahromadenia NADPH-d pozitívneho materiálu, čo pripomínalo tzv. corpusculum thymicum (obr. 4).

Krvné cievy boli lokalizované v septách (obr. 5), pričom ich endoteliálne bunky boli jasne NADPH-d pozitívne znečené. Pozoruhodné boli u zajaca NADPH-d pozitívne pletené vlákien prebiehajúce v tesnom susedstve ciev, ktoré pripomínali nervové vlákna.

Dreň týmusu potkana javila odlišnú distribúciu NADPH-d pozitívnych štruktúr. Intenzívne sfarbené bunky bolo možné pozorovať prevažne v oblasti kortikomedulárnej štrbiny, kde sa vyskytovali v nepravidelných intervaloch zoskupené v pruchoch (obr. 6). Len zriedkavo boli tieto bunky roztrúsené vo vnútri drene. V porovnaní s bunkami drene týmusu u zajaca preukazoval ich tvar vysoký stupeň nepravidelnosti s početnými výbežkami. Nepozorovali sme žiadne NADPH-d pozitívne nervové vlákna.

#### Diskusia

V našej práci sme sledovali histochemické znázornenie NADPH-d aktivity v týmusoch zajaca a potkana. Z literatúry je známe, že NADPH-d sa môže považovať za marker NOS, enzým zodpovedný za syntézu NO (4, 8, 17, 26). Aktivita tohto enzýmu sa dokázala v mnohých oblastiach nervového systému u cicavcov (1, 2, 14, 25, 26, 28). Okrem toho existujú dôkazy o prítomnosti NADPH-d aj v rôznych periférnych orgánoch (23, 29). Nedávne práce (11, 15) potvrdzujú distribúciu NADPH-d pozitívnych štruktúr u potkana a kurčata. Dosiaľ sme však nenašli údaje o prítomnosti NADPH-d v týmuse zajaca a o jeho možnom využití NO ako neurotransmitera.

NADPH-d pozitívna reakcia v kôre týmusov zajaca aj potkana bola podobná, ukazovala len ľahké sfarbenie, s jemne vyznačenými radiálne orientovanými cievami. Rozdielna bola distribúcia NADPH-d pozitivity v dreni. Kým u zajaca sme zistili difúzne rozptýlenie viac-menej pravidelných buniek s rôznou denzitou sfarbenia, u potkana bolo možné pozorovať zhluky nepravidelných buniek s výbežkami na rozhraní kôry a drene. Krvné cievy boli v dreni oboch experimentálnych zvierat výraznejšie sfarbené ako v ich kôre.

Pri sledovaní NADPH-d pozitívnych nervových štruktúr sme nepozorovali neuronálne telá v žiadnych rezoch týmusu. Ale ple-

tene vlákien podobné nervovým sa často vyskytovali v perivaskulárnej topografii u zajaca. Ich prítomnosť a ich lokalizácia v septách (známe dráhy vstupu autonómnej inervácie) dovoľujú predpokladať, že NO sa môže zúčastňovať na neurotransmisii v týmuse. Dôkazy o inervácii sa už objavili v prácach niektorých autorov (7, 22, 30). Potvrdzujú cholínergickú (6, 10, 12, 22) aj adrenergickú (7, 27, 30) zložku tejto inervácie. Objavili sa však aj údaje o NANC inervácii (3). NADPH-d aktivitu nedávno sledovali aj v nervových bunkách jazyka, hltana, močového mechúra, v nervových pleteniach panvy a v črevných stenách. Výsledky Shimosegawa a spol. (23) poukazujú na možnú účasť NO v hemodynamickú kontrole pankreasu, pretože NADPH-d aktivita sa pozorovala v jeho endokrinné aj exokrinné časti. Podobne sa aj v štítnej žľaze dokázali NADPH-d sfarbené telá nervových buniek, nervové vlákna a cievy endotel (29).

Analogicky s ostatnými periférnymi orgánmi možno uvažovať o existencii NANC vlákien v inervácii týmusu. Naše výsledky podporujú túto myšlienku prítomnosťou podobných vlákien v týmuse zajaca, hoci sa nedokázali u potkana, ani u kurčáta (11, 15). Aj keď nepoznáme jasné vysvetlenie tohto rozporného pozorovania, predsa existuje možnosť, že dôvodom by mohla byť druhová odlišnosť zvierat použitých v experimentoch. Tento názor podporujú aj pokusy, pri ktorých sa dokázala druhová špecificita v distribúcii NADPH-d pozitívnych nervových vlákien v pankrease (24). Tieto výsledky dovoľujú predpokladať, že NO môže ovplyvňovať pankreas rôznym spôsobom v závislosti od jednotlivých druhov experimentálnych zvierat. Pre konečný dôkaz existencie NANC vlákien v týmuse, a teda aj pre potvrdenie našich pozorovaní u zajaca bude potrebné uskutočniť experimenty s využitím iných podporných metód.

Naše výsledky ukázali distribúciu NADPH-d pozitívnych štruktúr v týmusoch zajaca a potkana. Slabo sfarbená kôra a tmavšia dreň sa dali ľahko rozlíšiť. Usporiadanie buniek v dreni zajaca bolo pravidelné, s rôznou denzitou sfarbenia. Bunky v dreni týmusu potkana boli intenzívne sfarbené, ale ich usporiadanie bolo nepravidelné, v pruhoch. Obzvlášť pozoruhodné boli NADPH-d pozitívne krvné cievy so zreteľne sfarbenými endotelovými bunkami a s jemnými, nervom podobnými vláknami, lokalizovanými perivaskulárne. Tieto výsledky podporujú domnienku, že NO sa zúčastňuje na regulácii funkcie týmusu.

## Literatúra

- Aimi Y., Fujimura M., Vincent S.R., Kimura H.:** Localization of NADPH-diaphorase containing neurons in sensory ganglia of the rat. *J. Comp. Neurol.*, 306, 1991, s. 382—392.
- Anderson C.R.:** NADPH diaphorase-positive neurons in the rat spinal cord include a subpopulation of autonomic preganglionic neurons. *Neurosci. Lett.*, 139, 1992, s. 280—284.
- Boeckxstaens G.E., Pelckmans P.A., Bult H., DeMan J.G., Herman A.G., Van Maercke:** The arginine-nitric oxide pathway mediates non-adrenergic non-cholinergic neurotransmission in gastrointestinal tissue. *Guanidine Comp. Biol. Med.*, Chapter, 13, 1992, s. 89—96.
- Bredt D.S., Glatt C.E., Hwang P.M., Fotuhi M., Dawson T.M., Snyder S.H.:** Nitric oxide synthase protein and mRNA are discretely localized in neuronal populations of the mammalian CNS together with NADPH diaphorase. *Neuron*, 7, 1991, s. 615—624.
- Bredt D.S., Snyder S.H.:** Nitric oxide a novel neuronal messenger. *Neuron*, 8, 1992, s. 3—11.
- Bullock K.:** A light and ultrastructural analysis of innervation of the thymus gland during the perinatal period. *Soc. Neurosci. Abstr.*, 8, 1982, s. 7.
- Bullock K., Pomerantz W.:** Autonomic nervous system innervation of thymic-related lymphoid tissue in wild-type and nude-mice. *J. Comp. Neurol.*, 228, 1984, s. 57—68.
- Dawson T.M., Bredt D.S., Fotuhi M., Hwang P.M., Snyder S.H.:** Nitric oxide synthase and neuronal NADPH diaphorase are identical in brain and peripheral tissues. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 7797—7801.
- Dawson T.M., Dawson V.L., Snyder S.H.:** A novel neuronal messenger molecule in brain: the free radical, nitric oxide. *Ann. Neurol.*, 32, 1992, s. 297—311.
- Dorko F., Gomboš A., Kočíšová M.:** Development of ACHE-positive innervation of the rat thymus during prenatal and postnatal period. *Func. Develop. Morphol.*, 4, 1994, s. 139—140.
- Downing J.E.G.:** Multiple nitric oxide synthase systems in adult rat thymus revealed using NADPH diaphorase histochemistry. *Immunology*, 82, 1994, s. 659—664.
- Fatani J.A., Quayyum M.A., Mohta L., Singh V.:** Parasympathetic innervation of the thymus a histochemical and immunocytochemical study. *J. Anat.*, 147, 1986, s. 115—119.
- Furchgott R.F.:** The role of endothelium in the responses of vascular smooth muscle to drugs. *A. Rev. Pharm. Toxicol.*, 24, 1984, s. 175—197.
- Grozdanovic Z., Baumgarten H.G., Bruning G.:** Histochemistry of NADPH-diaphorase, a marker for neuronal nitric oxide synthase, in the peripheral autonomic nervous system of the mouse. *Neurosci.*, 48, 1992, s. 225—235.
- Gulati P., Chan A.S., Leong S.K.:** NADPH-diaphorase positive cells in the chick and rat thymus. *Thymus*, 22, 1993, s. 117—124.
- Hope B.T., Vincent S.R.:** Histochemical characterization of neuronal NADPH-diaphorase. *J. Histochem. Cytochem.*, 1989, s. 653—661.
- Hope B.T., Michael G.J., Knigge K.M., Vincent S.R.:** Neuronal NADPH-diaphorase is a nitric oxide synthase. *proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88, 1991, s. 2811—2814.
- Kiechle F.L., Maliski T.:** Nitric oxide biochemistry, pathophysiology, and detection. *Amer. J. Clin. Pathol.*, 100, 1993, s. 567—573.
- Kluchová D., Kočíšová M., Petříčková I., Mirossay L.:** Oxid dusíka a jeho účinky v organizme. *Slov. Lekár.*, 1994, č. 10, s. 18—22.
- Koshland D.E.:** The molecule of the Year. *Science*, 258, 1992, s. 1861—1862.
- Mizukawa K.:** Reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate-diaphorase histochemistry: Light and electron microscopic investigations. *Methods Neurosci.*, 3, 1990, s. 457—472.
- Ničič M., Leposavič G., Ugrešič N., Bogojevič M., Isakovič K.:** Parasympathetic innervation of the rat thymus during first life period: Histochemical and biochemical study. *Thymus*, 19, 1992, s. 173—182.
- Shimosegawa T., Abe T., Satoh A., Asakura T., Yoshida K., Koizumi M., Toyota T.:** Histochemical demonstration of NADPH-diaphorase activity, a marker for nitric oxide synthase, in neurons of the rat pancreas. *Neurosci. Lett.*, 148, 1992, s. 67—70.
- Shimosegawa T., Takashi A., Akihiko S., Reishi A., Yoshifumi K., Masaru K., Takayoshi T.:** NADPH-diaphorase activity in neurons of the mam-

malian pancreas: Coexpression with vasoactive intestinal polypeptide. *Gastroenterology*, 195, 1993, s. 999–1008.

**Scherer-Singler U., Vincent S.R., Kimura H., McGeer E.G.:** Demonstration of a unique population of neurons with NADPH-diaphorase histochemistry. *J. Neurosci. Methods*, 8, 1983, s. 229–234.

**Schmidt H.H.H.W., Gague G.D., Nakane M., Pollock J.S., Miller M.F., Murad E:** Mapping of neural NO synthase in the rat suggest frequent colocalization with NADPH-diaphorase but not soluble guanylyl cyclase and novel paraneural functions for nitrinergic signal transduction. *J. Histochem. Cytochem.*, 40, 1992, s. 1439–1456.

**Singh U.:** Sympathetic innervation of fetal mouse thymus. *Europ. J. Immunol.*, 14, 1984, s. 757–759.

**Valtschanoff J.G., Weinberg R.J., Rustioni A.:** NADPH-diaphorase in the spinal cord of rats. *J. Comp. Neurol.*, 321, 1992, s. 209–222.

**Syed M.A., Leong S.K., Chan A.S.:** Localization of NADPH-diaphorase reactivity in the chick and mouse thyroid gland. *Thyroid*, 4, 1994, s. 475–478.

**Williams J.M., Felten D.L.:** Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: A comparative histofluorescence study. *Anat. Rec.*, 199, 1981, s. 531–542.

Do redakcie došlo 12.2.1996.

---

## LIST REDAKCII

---

Dear colleague,

With much interest I read article about *Financial equivalent, industry sponsored research and conflict of interest* (Bratisl Lek Listy 1997; 98: 5–7). An author raises important questions, which are well known in Western Europe also. Especially in countries with bad economic circumstances it seems rather difficult to make the choices mentioned. Medical research is a must and if no money is available the only possibility to get it, will be via sponsors mostly coming from industry. Under bad financial circumstances there is no other choice, I suppose. The only way, to do research is to accept sponsor-money, if somebody can get it. In a contract it is possible to try to lay down an agreement in which professional autonomy as a researcher is guaranteed. In that case there will be no reason to refuse a fee, if the sponsor offers it.

In case of not having a contract as mentioned, the situation changes only a little bit. There could be a temptation for the researcher to produce figures which are favourable for the instructing body or firm. At the other hand this body has no interest in false data. They help only temporarily. The truth will be shown latter.

Of course it is clear, that if research is harmful to patients and not directed to their interests, important ethical issues are at stake. A medical doctor has promised by oath to do nothing which is aga-

inst the interest or the will of a patient. In many cases it is impossible to predict results and therefore exists uncertainty. If the patient agrees and takes the risk together with the doctor, than a trial can take place. If the patient refuses, the doctor has to stop it.

In general: to start a research project there must be a real chance for recovery or the patient is accepting to be a guinee-pig in case his medical condition is nearly hopeless. Without consent of the patient nothing can be done. A doctor need to give honest information, without thinking on his own interests as a researcher or somebody who lives in penury.

It seems to me that most of the doctors in Western Europe have the opinion I just described. Only a very few accept research projects in any case if they get to be payed for doing so especially. Author mentioned the roles of a physician: scientist, teacher, healer, protector, public health manager and patients advocate. These roles are present together allways and no one can be neglected. They are all there at the same time.

Prof.Dr. *M. van Andel*  
 Beatrixlaan 1  
 3851 RT Ermelo  
 The Netherlands  
 Phone: +31.341.552 102