

BADANIE CHOROBY RESZTKOWEJ U CHORYCH NA SZPICZAKA MNOGIEGO. CZ. I. BADANIE ZA POMOCĄ CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

MINIMAL RESIDUAL DISEASE ASSESSMENT IN MULTIPLE
MYELOMA PATIENTS. PART I. FLOW CYTHOMETRY METHOD

Małgorzata ROKICKA, Tigran TOROSIAN

Katedra i Klinika Hematologii, Onkologii i Chorób Wewnętrznych AM w Warszawie

Streszczenie Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia chorych na MM wiąże się z koniecznością poszukiwania lepszych technik oceny choroby resztkowej – MRD (ang. *minimal residual disease*) umożliwiających wczesne rozpoznanie i leczenie nawrotu choroby. Najczęściej stosuje się metody fenotypowania i cytometrii przepływowej oraz różne rodzaje ilościowego i jakościowego PCR. W artykule przedstawiono wady i zalety oraz zastosowanie kliniczne różnych metod badania MRD u chorych na MM.

Słowa kluczowe: szpiczak mnogi, choroba resztkowa, cytometria przepływowa.

Summary: Introducing of the new methods of treatment of MM patients is connected with necessity of searching for more sophisticated methods of MRD evaluation and earlier diagnosis and treatment of relapse. The most often used methods are the fenotyping with flow cytometry and different types of qualitative and quantitative PCR. The merits and drawbacks of different method MRD evaluation are described.

Key words: multiple myeloma, minimal residual disease, flow cytometry.

WPROWADZENIE

Szpiczak mnogi – MM (ang. *myeloma multiplex*) jest nowotworem, charakteryzującym się niekontrolowanym rozrostem plazmocytoów. Choroba poddaje się leczeniu standardową chemioterapią, jednak niemożliwe jest za pomocą tej metody całkowite wyleczenie MM. Po leczeniu konwencjonalnym średni czas przeżycia chorych wynosi

30 miesięcy. Zastosowanie wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganą przeszczepieniem autologicznych komórek macierzystych pozyskanych ze szpiku (ABMT z ang. *autologous bone marrow transplantation*) lub z krwi obwodowej (PBSCT z ang. *peripheral blood stem cell transplantation*) poprawiło wyniki leczenia – częściej udaje się uzyskać całkowitą remisję choroby, wydłużył się czas przeżycia chorych bez objawów choroby oraz czas ich całkowitego przeżycia. Jednak nadal nieuchronny jest nawrót choroby.

Postępy terapii MM stwarzają pilną potrzebę opracowania metod badania obecności MRD w celu monitorowania odpowiedzi na różne typy leczenia oraz analizy materiału przeszczepianego pod kątem zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi. Badanie MRD może mieć również istotne znaczenie w poznaniu patofizjologii i biologii choroby [2].

PATOFIZJOLOGIA DOJRZEWANIA PLAZMOCYTÓW A IDENTYFIKACJA KOMÓREK NOWOTWOROWYCH U CHORYCH NA MM

Możliwość badania MRD u chorych na MM jest uwarunkowana znajomością określonych, charakterystycznych cech komórek nowotworowych. Są one następnie identyfikowane za pomocą różnych metod.

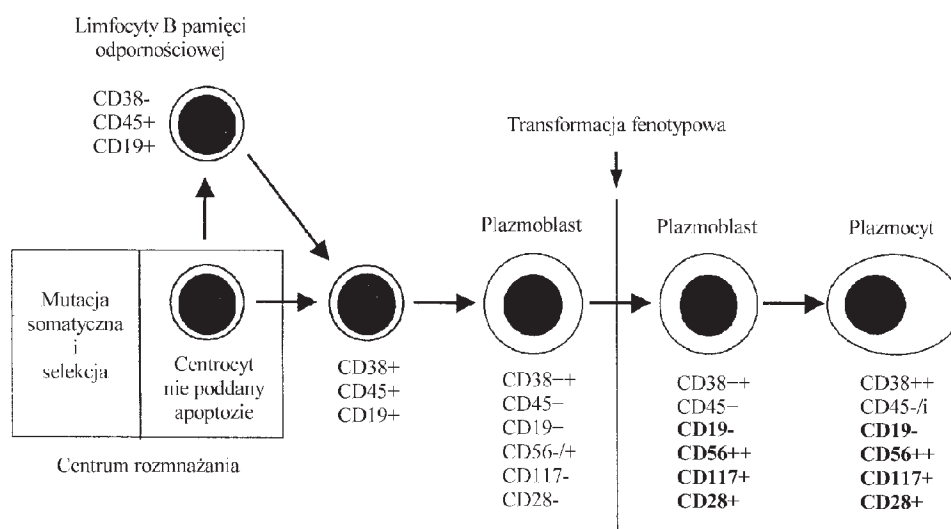
Główną populacją komórek nowotworowych MM, łatwo rozpoznawalną cytologicznie, są oczywiście plazmocyty. Nie można jednak rozróżnić w ten sposób plazmocyty patologicznych od prawidłowych, podczas gdy do klonu komórek nowotworowych w MM należą również postaci prekursorowe plazmocyty, czyli znajdujące się na różnych szczeblach dojrzewania limfocyty B [10,16]. W ostatnich piętnastu latach opracowano dokładniejsze techniki badawcze uniezależniające identyfikację komórek MM od badania cytologicznego. Okazało się bowiem, że komórki nowotworowe, określane w piśmiennictwie również jako klonogenne, mogą charakteryzować się nietypową, różną od fizjologicznej, ekspresją antygenów powierzchniowych. Antygeny te wykrywa się swoistymi przeciwciałami monoklonalnymi znakowanymi fluorochromami za pomocą cytometrii przepływowej. Komórki nowotworowe można zidentyfikować także za pomocą nowoczesnych technik biologii molekularnej poprzez wykrycie swoistego przegrupowania genów kodujących informację dla części zmiennej łańcucha ciężkiego cząsteczek immunoglobulin (Ig). Techniki fenotypowania i molekularne będą przedmiotem odrębnego omówienia.

Transformacja fenotypowa, czyli pojawianie się nietypowego zestawu antygenów powierzchniowych na komórkach nowotworowych MM, ma miejsce najprawdopodobniej na szczeblu plazmoblastu. Fizjologicznie, w procesie dojrzewania limfocytów B po opuszczeniu ośrodków rozmnażania w węzle chłonnym, ekspresja antygenów powierzchniowych: CD19, CD45 i Ig powierzchniowych (sIg) zmniejsza się, natomiast zwiększa się ekspresja antygeny CD38. Kolejne szczeble dojrzewania limfocytów B można określić poprzez badanie ekspresji swoistych antygenów powierzchniowych. Plazmocyty są komórkami charakteryzującymi się ekspresją antygenów powierzchniowych CD38⁺⁺/CD45⁻/CD19⁺, plazmoblasty określa fenotyp CD38⁺⁺/CD45⁺/CD19⁺, a limfocyty B: CD38⁻/CD45⁺/CD19⁺ [13].

Dodatkowo, dla rozróżnienia plazmocytoów nowotworowych od prawidłowych ma znaczenie badanie ekspresji antygenu CD56 i CD138. U chorych na MM, klon nowotworowy plazmocytoów charakteryzuje się fenotypem CD38++/CD56++/CD19+, podczas gdy u osób zdrowych plazmocyty cechuje ekspresja antygenów CD38++/CD56–/+/CD19+. Populacja plazmocytoów nowotworowych różni się zatem od zdrowych brakiem ekspresji antygenu CD 19 oraz raczej niewielkim natężeniem ekspresji antygenu CD56. Na większości plazmocytoów chorych na MM oraz komórkach wywodzących się z plazmocytoarnych linii komórkowych stwierdza się ekspresję antygenu CD138, który w warunkach fizjologicznych jest obecny na dojrzałych plazmocytach [17]. Nowotworowe plazmocyty izolowane zarówno ze szpiku, jak i ze krwi obwodowej może znamionować ponadto nieprawidłowa ekspresja antygenów CD28, CD117 [7,13]. U większości chorych na MM plazmoblasty można zidentyfikować w obrębie subpopulacji komórek o fenotypie CD38++/CD45++; mogą się one charakteryzować zarówno ekspresją antygenu CD19+, jak i jej brakiem. Nieprawidłowe antygeny: CD56, CD117 i CD28 uważane za charakterystyczne dla komórek szpiczaka udaje się wykryć jedynie na komórkach pozbawionych ekspresji antygenu CD19 [14].

Utrata ekspresji antygenu CD19 przez plazmocyty jest uważana za charakterystyczny etap procesu transformacji nowotworowej tych komórek. Mohamoud i wsp. wykazali, że antygen CD19 bierze udział w regulacji proliferacji nowotworowych linii komórkowych wywodzących się z plazmocytoów [9]. Białko identyfikowane przez przeciwciała CD19 może być produktem genu hamującego wzrost komórek w drodze przezbłonowej transdukcji sygnału. Przypuszczalnie ostatni etap onkogenezy w procesie powstawania MM dotyczy stadium plazmoblastu [6]. Komórki nowotworowe należące do klonu MM zidentyfikowano w populacji limfocytów B znajdujących się w stadium dojrzewania poprzedzającym etap plazmoblastu za pomocą ASO IgH RT-PCR, co potwierdza tę hipotezę [3,14].

Hipotetyczny przebieg transformacji nowotworowej w MM przedstawiono na rycinie 1. Najbardziej niedojrzałą komórką klonogenną jest limfocyt wywodzący się z ośrodków rozmnażania w węzle chłonnym, czyli centrocyt powstały po stymulacji antygenowej i selekcji. W przeciwieństwie do warunków prawidłowych nie podlega on uśmierceniu w następstwie apoptozy. Centrocyty potencjalnie charakteryzuje zdolność do różnicowania się bądź do komórek pamięci odpornościowej, bądź do plazmoblastów. Proces ten wiąże się z uruchomieniem mechanizmu przegrupowania genów kodujących immunoglobuliny (Ig). Najczęstszy typ nieprawidłowości genetycznych u chorych na MM, czyli translokację 14q32 obejmującą rejon rekombinacji somatycznej genów dla Ig, wykrywa się także u osób z rozpoznaniem gammapatii monoklonalnej o nieustalonym znaczeniu (MGUS ang. *monoclonal gammopathy of undetermined significance*). MGUS stanowi najprawdopodobniej etap poprzedzający transformację nowotworową do komórek MM. Klonogenne limfocyty B lub plazmoblasty nie można uznać jeszcze za komórki nowotworowe, ale są one nieśmiertelnym potomstwem centrocytoów. Te ostatnie uważa się zatem za komórki prekursorowe MM [14]. Z tej również populacji wywodzi się najprawdopodobniej klon komórek opornych na wysokodawkowaną chemioterapię.



RYCINA 1. Dojrzewanie komórki szpiczakowej. Limfocyty B należą do klonu komórek szpiczaka. Najmniej różnicowaną komórką jest centrocyt, który po ekspozycji na antygen nie ginie w procesie apoptozy. Centrocyt może różnicować się do limfocytów B pamięci odpornościowej lub plazmocyty. Komórka pamięci odpornościowej może być komórką prekursorową dla szpiczaka. Na etapie plazmoblastu dochodzi do transformacji fenotypowej: zmniejsza się ekspresja antygenu CD19, następuje ekspresję markerów nowotworowych CD56, CD28, CD117 (zmodyfikowane – wg Ramussen i wsp.)

METODY BADANIA MRD

Standardowe kryteria remisji MM stosowane w praktyce klinicznej zaproponowali Blade i wsp. Obejmują one badanie: stężenia białka monoklonalnego w surowicy lub białkomoczu dobowego (w przypadkach choroby łańcuchów lekkich), odsetka plazmocytołów w szpiku i ocenę swoistych zmian osteolitycznych w badaniu radiologicznym kości [4]. Wprowadzenie nowoczesnych metod leczenia, zwłaszcza wysokodawkowanej chemioterapii wspomaganej SCT, stworzyło nagłą potrzebę wynalezienia udoskonalonych metod badania choroby resztkowej (MRD) umożliwiających wykrywanie małych liczb komórek nowotworowych. Po transplantacji komórek krwiotwórczych konieczne jest precyzyjne monitorowanie chorych pod kątem pojawienia się komórek nowotworowych w szpiku lub w krwi obwodowej. Określanie całkowitej remisji MM klasycznymi metodami jest niewystarczające ze względu na ich małą czułość. W praktyce klinicznej ważne jest ponadto możliwie wczesne wykrycie nawrotu choroby. Nowoczesne protokoły lecznicze, pomimo coraz większej skuteczności, nie doprowadzają do usunięcia wszystkich klonogennych komórek MM z organizmu. Próg wykrywalności komórek nowotworowych za pomocą technik cytomorfologicznych wynosi 1–5%, co w praktyce oznacza, że dostarczają one jedynie orientacyjnych informacji na temat skuteczności leczenia. Ponadto w przypadku leczenia przeszczepianiem autologicznych komórek macierzystych istotne jest określenie stopnia „zanieczyszczenia” materiału przeszczepowego komórkami nowotworowymi. Pożądana czułość technik oceniających MRD wynosi co najmniej 10^{-3} komórek (jedna komórka

nowotworowa na 1000 prawidłowych). Docelowo poszukuje się metod umożliwiających precyzyjne wykrywanie i monitorowanie MRD charakteryzujących się czułością od 10^{-4} do 10^{-6} komórek MM.

W ostatnich kilkunastu latach wprowadzono wymienione poniżej metody badania MRD u chorych na MM:

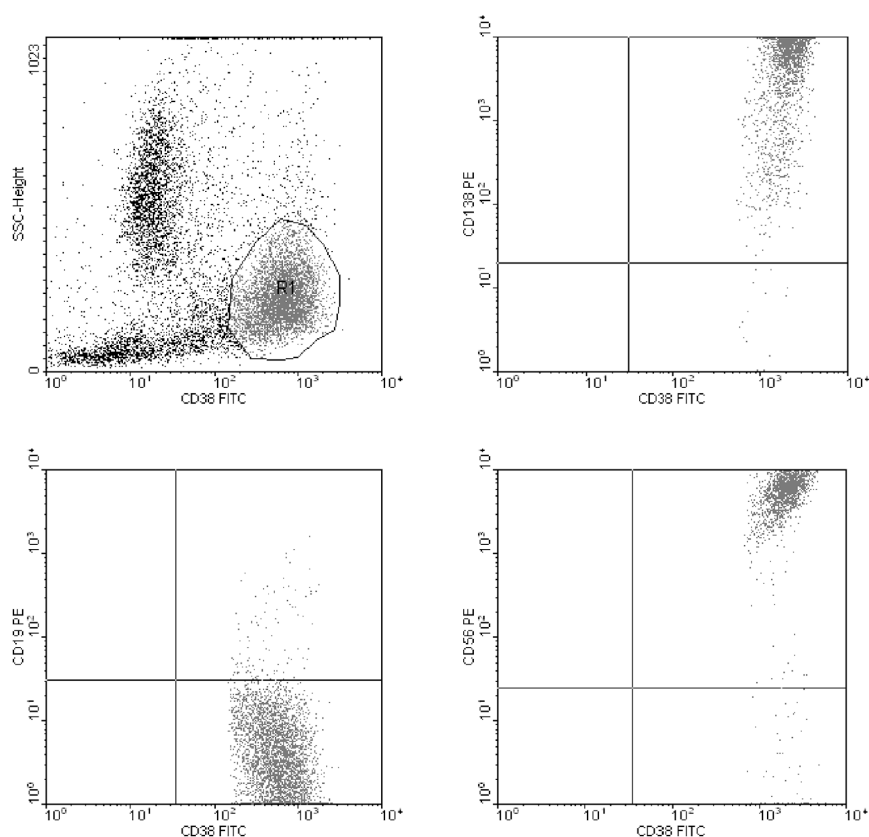
- a) cytogenetyka: charakteryzuje się czułością 10^{-2} komórek, zastosowanie jest ograniczone do przypadków MM z obecnością charakterystycznej aberracji chromosomalnej i uzyskania komórek nowotworowych w fazie metafazy cyklu komórkowego,
- b) technika FISH: charakteryzuje się czułością 10^{-2} do 10^{-3} komórek nowotworowych, możliwe zastosowanie również tylko w przypadkach z określoną aberracją chromosomalną, do której identyfikacji są dostępne komplementarne sondy DNA [5],
- c) hybrydyzacja Southern służy do identyfikacji określonego fragmentu DNA – czułość metody szacuje się na 10^{-2} do 10^{-3} komórek nowotworowych,
- d) fenotypowanie komórek za pomocą cytometrii przepływowej – analiza markerów immunologicznych komórek klonogennych MM, czułość szacuje się na 10^{-3} komórek nowotworowych,
- e) technika łańcuchowej polimerazy (PCR ang. *polymerase chain reaction*) czułość wynosi 10^{-4} do 10^{-5} komórek nowotworowych.

Ostatnie dwie z wymienionych wyżej metod badania MRD są coraz częściej stosowane u chorych na MM i będą one przedmiotem szczegółowego omówienia.

ANALIZA MARKERÓW IMMUNOLOGICZNYCH – BADANIE MRD U CHORYCH NA MM ZA POMOCĄ FENOTYPOWANIA I CYTOMETRII PRZEPŁYWOWEJ

Harada i wsp. wykazali za pomocą techniki dwukolorowej cytometrii przepływowej, że jednoczesne oznaczenie ekspresji antygenu CD38 przeciwciałami znakowanymi FITC i ekspresji antygenów: VLA-4, VLA-5, MPC-1, CD44, CD55, CD19, CD20, CD24, CD10 przy użyciu przeciwciał znakowanych PE umożliwia odróżnienie plazmocyto- nowotworowych od prawidłowych. Jak uprzednio wspomniano, u osób zdrowych plazmocyty identyfikowane jako CD38⁺⁺ charakteryzują się ekspresją antygenu CD19, natomiast są niemal pozbawione ekspresji antygenu CD56. U chorych na MM komórki CD 38⁺⁺ nie wykazują ekspresji antygenu CD19, natomiast w większości przypadków wykrywa się antygen CD56. Wyniki badań Harady i wsp. potwierdziły tę obserwację. Badania chorych z rozpoznaniem MGUS, uważanej za stan poprzedzający ujawnienie się MM, wykazały po analizie ekspresji tych trzech antygenów występowanie zarówno plazmocyto- wów o prawidłowym, jak i nowotworowym fenotypie. Oznaczanie ekspresji wymienionych antygenów może zatem służyć do rozpoznawania i monitorowania leczenia chorych na MM i MGUS w praktyce klinicznej [7, 8]. Ilustrację metody badania fenotypowego komórek nowotworowych MM przedstawiono na rycinie 2.

Techniką cytometrii przepływowej posłużył się Pope i wsp. do badania zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi materiału przeszczepowego uzyskanego w drodze



RYCINA 2. Przykładowy wynik fenotypu komórek szpiku chorego na szpiczaka mnogiego (ze zbiorów Kliniki)

leukaferez. Metodę oznaczania antygenów CD38⁺⁺ na komórkach nowotworowych wzbogacono o wykrywanie poziomu tzw. restrykcji łańcuchów lekkich w tych komórkach, czyli określania stosunku cytoplazmatycznych łańcuchów lambda do kappa. Obecność jednego rodzaju łańcuchów lekkich w plazmocytach dowodzi ich charakteru nowotworowego. We wszystkich badanych produktach leukaferez stwierdzono obecność plazmocytoów, ale restrykcję izotypową (jeden rodzaj łańcuchów lekkich w komórkach) stwierdzono jedynie w 16% badanych próbek. Autorzy wnioskują, że plazmocyty obecne w produktach leukaferez w większości reprezentują typ poliklonalny wytwarzania łańcuchów lekkich, ale niektóre z nich charakteryzują się typem monoklonalnym identyfikowanym zwłaszcza we frakcji dojrzałych plazmocytoów [12].

Porównywano również stopień zanieczyszczenia komórkami nowotworowymi produktów leukaferez u chorych na MM, w grupach mobilizowanych tradycyjnie tylko cyklofosfamidem oraz poprzez chemioterapię nacelowaną na tzw. oczyszczanie *in vivo* (ang. *purging in vivo*) polegające na podaniu skojarzonej, sekwencyjnej chemioterapii wysokodawkowanej zawierającej poza cyklofosfamidem, wepezyd oraz deksametazon w celu zmniejszenia stopnia potencjalnej MRD. Zastosowano oznaczanie

liczby plazmacytów nowotworowych za pomocą cytometrii przepływowej określając ekspresję antygenów CD38 i CD38 z jednoczesną ekspresją nieprawidłowego antygeny CD138 na tych komórkach. Stwierdzono, że chemoterapia nakierowana na oczyszczanie *in vivo* umożliwia uzyskanie materiału przeszczepowego o mniejszym zanieczyszczeniu komórkami klonogennymi MM, ale ich nie eliminuje [11].

Almeida i wsp. wykazali, że czułość badania MRD za pomocą cytometrii przepływowej można zwiększyć poprzez jednoczesne oznaczanie zawartości DNA w komórkach MM. U około 60% chorych na MM stwierdza się aneuploidię. Badaniem objęto grupę chorych w okresie remisji całkowitej ustalonej zgodnie z klasycznymi kryteriami. Równoczesne immunofenotypowanie i badanie zawartości (ploidy) DNA przeprowadzono w próbkach szpiku i materiału przeszczepowego uzyskanego w drodze leukaferazy. W oddzielonej populacji komórek CD 38+++ / 138+ oznaczano występowanie nieprawidłowego fenotypu CD56+, CD28+ oraz CD33+ i asynchronicznej ekspresji antygenów CD117, sIg i CD20. Badanie zawartości DNA oparto na barwieniu jodkiem propydydy. Zastosowanie tych dwu technik umożliwiło wykrycie nieprawidłowego lub/i aneuploidalnego fenotypu u 95% chorych. Cechy MRD stwierdzano zarówno w szpiku chorych po PBSCT, jak i w próbkach materiału przeszczepowego. Autorzy szacują czułość opisanej metody na 10^{-5} , co odpowiada w przybliżeniu czułości metod molekularnych [1].

W 2002 roku Rawstron i wsp. opublikowali wyniki badania MRD jednocześnie za pomocą dwu metod: cytometrii przepływowej i PCR u chorych na MM leczonych wysokodawkowaną chemioterapią. Autorzy zastosowali metodę cytometrii przepływowej ze specjalnym sposobem wstępnego bramkowania i separacji komórek nowotworowych MM na podstawie ekspresji antygenów CD138 i CD19. Z uzyskanej w ten sposób populacji komórek izolowano następną, wysoce oczyszczoną populację komórek nowotworowych, charakteryzującą się ekspresją antygenów CD19 i CD56. Autorzy podkreślają, że duże znaczenie dla tego rodzaju diagnostyki ma jakość badanego materiału, która zależy od techniki pobrania szpiku (konieczne badanie pierwszej puli komórek z aspiratu szpiku), jakość i precyzja bramkowania komórek w trakcie wykonywania badania. Przy zachowaniu wskazanych warunków czułość metody jest zbliżona do czułości metod molekularnych, a nawet może ją przewyższać, biorąc pod uwagę trudności techniczne wykonywania niektórych metod molekularnych. Analiza materiału klinicznego umożliwiła wyodrębnienie grup chorych o różnym rokowaniu w zależności od stopnia MRD [15]. Metoda podwójnego, stopniowanego bramkowania w czasie cytometrii przepływowej wydaje się obiecująca, jednak dla oceny jej znaczenia klinicznego konieczne są dalsze badania porównawcze przeprowadzane przez inne ośrodki.

PIŚMIENNICTWO

- [1] ALMEIDA J., ORFAO A., OCQUETEAU M., MATEO G., CORRAL M., CABALLERO M. D. High-sensitive immunophenotyping and DNA ploidy studies for the investigation of minimal residual disease in multiple myeloma. *Br J Haematol* 1999; **107**: 121–131.
- [2] ATTAL M., HAROSSEAU JL., STOPPA AM., SOTTO JJ., FUZIBET JG., ROSSI JF., CASASSUS P., MAISONNEUVE H., FACON T., IFRAH N., PAYEN C., BATAILLE R. A prospective, randomized trial of autologous bone marrow transplantation and chemotherapy in multiple myeloma. *New Engl J Med* 1996; **335**: 991–997.

- [3] BILLADEAU D, AHMANN G, GREIPP P, VAN NB. The bone marrow of multiple myeloma patients contains B cell populations at different stages of differentiation that are clonally related to the malignant plasma cell. *J Exp Med* 1993; **178**: 1023–1031.
- [4] BLADE J, SAMSON D, RECCE D, APPERLEY J, BJORKSTRAND B, GAHRTON G, GERTZ M, GIRALT S, JAGANATH S, VESOLE D. Criteria for evaluating disease response and progression in patients with multiple myeloma treated by high-dose therapy and haemopoietic stem cell transplantation. *Br J Haematol* 1998; **102**: 1115–1123.
- [5] GENEVIEVE F, ZANDECKI M, LAI JL, HENNACHE B, FAUCOMPRES JL, STALNIKIEWICZ L, BAUTERS F, FACON T. Evaluation of minimal residual disease by interphase FISH in multiple myeloma: does complete remission exist? *Leukemia* 1999; **13**: 641–644.
- [6] HALLEK M, LEIF BP, ANDERSON KC. Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 1998; **91**: 2–21.
- [7] HARADA H, KAWANO MM, HUANG N, HARADA Y, IWATO K, TANABE O, SAKAI A, ASAOKU H, KURAMOTO A. Phenotypic difference of normal plasma cells from mature myeloma cells. *Blood* 1993; **81**: 2658–2663.
- [8] LIN P, OWENS R, TRICOT G, WILSON C S. Flow cytometric immunophenotypic analysis of cases of multiple myeloma. *Am J Clin Pathol* 2004; **121**: 482–488.
- [9] MAHMOUD MS, FUJI R, ISHIKAWA H, KAWANO MM. Enforced CD19 expression leads to growth inhibition and reduced tumorigenicity. *Blood* 1999; **94**: 3551–3558.
- [10] OCQUETEAU M, ORFAO A, ALMEIDA J, BLADE J, GONZALES M, GARCIA-SANZ R, LOPEZ-BERGES MC, MORO MJ, HERNANDEZ J, ESCRIBANO L, CABALLERO MD, ROZMAN M, SAN-MIGUEL JF. Gammopathy of undetermined significance patients. Implications for the immunophenotypic characterization of plasma cells from monoclonal differential diagnosis between MGUS and multiple myeloma. *Am J Pathol* 1998; **152**: 1655–1665.
- [11] OMEDE P, TARELLA C, PALUMBO A, ARGENTINI CH, CARACCILOLO D, CORRADINI P, DOMINETTO A, GIARETTA F, RAVAGLIA R, TRIOLO R, TRIOLO S, PILERI A, BOCCADORO M. Multiple myeloma: reduced plasma cell contamination in peripheral blood progenitor cell collections performed after repeated high-dose chemotherapy courses. *Br J Haematol* 1997; **99**: 685–691.
- [12] POPE B, BROWN, GIBSON J, JOSHUA D. Plasma cell in peripheral blood stem cell harvests from patients with multiple myeloma are predominantly polyclonal. *Bone Marrow Transplant* 1997; **20**: 205–210.
- [13] RASMUSSEN T, JENSEN L, JOHNSEN HE. The clonal hierarchy in multiple myeloma. *Acta Oncol* 2001; **39**: 765–770.
- [14] RASMUSSEN T. The presence of circulating clonal CD19 cells in multiple myeloma. *Leuk Lymph* 2001; **42**: 1359–1366.
- [15] RAWSTRON AC, DAVIES FE, DASGUPTA A R, ASHCROFT J, PATMORE R, DRAYSON MT, OWEN RG, JACK AS, CHILD JA, MORGAN GJ. Flow cytometric disease monitoring in multiple myeloma: the relationship between normal and neoplastic cells predicts outcome after transplantation. *Blood* 2002; **100**: 3095–3100.
- [16] RUIZ-ARGUELLES GJ, SAN MIGUEL JF. Cell surface markers in multiple myeloma. *Mayo Clin Proc* 1994; **69**: 684–690.
- [17] WIJDENES J, VOOJI WC, CLEMENT C, POST J, MORARD F, VITA N, LAURENT P, SUN RX, KLEIN B, DORE JM. A plasmacyte selective monoclonal antibody (B-B4) recognizes syndecan-1. *Br J Haematol* 1996; **94**: 318–323.

Redaktor prowadzący – Jan Żeromski

Otrzymano: 01.10.2004 r.

Przyjęto: 04.03.2005 r.

ul. Banacha 1a, 02-097 Warszawa

e-mail: mrokicka@amwaw.edu.pl