

Znaczenie apoptozy w parazytozach

TADEUSZ WOJCIECH ŁAPIŃSKI

Wojewódzki Szpital Specjalistyczny im. K. Dłuskiego, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok

Łapiński T. W.

Significance of apoptosis in parasitosis

Summary

Parasitosis occurs often in Poland. Number of those cases increase among others from reason of touristy departures to countries of endemic diseases such as malaria, amoebiasis, giardiasis. By many years were been careful, that symptoms of parasitic diseases are connected from damaging of etiologic factor onto cells directly. Investigation above role of programmed death of cells in parasitic diseases, showed importance of this occurrence in the course of disease. These observations are essential, because possibilities of extension of therapeutic workings create among patients with parasitosis.

Keywords: parasitosis, apoptosis

Inwazje pasożytnicze wśród ludzi występują często, a ich najczęstszą przyczyną jest bezpośredni kontakt ze zwierzętami lub środowiskiem. Najpoważniejsze parazytozy występują na skutek zarażenia pierwotniakami, a wśród nich zarodźcami zimnicy (*Plasmodium sp.*). Szacuje się, że od 300 do 500 milionów osób, około 40% populacji świata, choruje na tę chorobę. Innym groźnym pierwotniakiem, będącym przyczyną zachorowań 10% populacji wszystkich ludzi jest *Entamoeba histolytica*. Zarażenie to jest przyczyną zgonów od 40 do 110 000 osób rocznie. Badania epidemiologiczne wskazują, że około 1,3 miliarda ludzi zarażonych jest glistą ludzką. Śmiertelność w inwazjach przywrami z rodziny *Schistosomatidae* wynosi około 250 000 osób rocznie.

Wniknięcie pasożyta do organizmu po przełamaniu barier mechanicznych i chemicznych powoduje wystąpienie lokalnego odczynu zapalnego. Uczestniczą w nim czynniki nieswoistej obrony immunologicznej. Swoista, humoralna obrona immunologiczna ma szczególne znaczenie w zarażeniach pasożytami lokalizującymi się pozakomórkowo. Odpowiedź komórkowa jest niezbędna w eliminacji pasożytów bytujących wewnątrzkomórkowo. W większości zarażeń, we wczesniej, ostrej fazie choroby uruchamiane są mechanizmy fagocytozy i nieswoistej odpowiedzi immunologicznej zależnej od cytokin. W późniejszym okresie dominującą rolę pełnią reakcje cytotoksyczne.

Programowana śmierć komórki

Procesy programowanej śmierci komórki (PSK) są jedną z form eliminacji zakażonych, zarażonych, fizycznie lub chemicznie uszkodzonych komórek.

Usuwane tą drogą komórki mogą wykazywać prawidłowe lub zaburzone funkcje. Zarażone komórki mogą funkcjonować prawidłowo, ale czynnik chorobotwórczy często inicjuje lub hamuje w nich procesy PSK. W procesach zapalno-martwiczych dochodzi do zniszczenia nie tylko komórek zawierających czynniki chorobotwórcze, ale również uszkodzenia komórek sąsiadujących (21). Towarzyszący stan zapalny wpływa na uszkodzenie przestrzeni międzykomórkowej oraz pobudza komórki fagocytarne. W procesach PSK nie dochodzi do uszkodzeń komórek sąsiadujących ani też nie występuje stan zapalny. PSK rozpoczyna się po pobudzeniu przez czynnik chorobotwórczy:

- swoistych receptorów, zwanych domenami śmierci (takich jak Fas, TRAIL i inne), znajdujących się na błonach komórkowych,
- perforyn odpowiedzialnych za powstawanie tuneleli w błonie komórkowej, powodujących zaburzenia jonowe oraz umożliwiające wnikanie cząstek aktywnych (typu granzymy),
- wewnątrzkomórkowych, głównie mitochondrialnych mechanizmów odpowiedzialnych za syntezę aktywnych czynników, takich jak cytochrom C oraz uwolnienie w procesach energetycznych komórki aktywnego tlenu.

Po inicjacji procesów PSK, będących najczęściej skutkiem pobudzenia receptorów śmierci, następuje aktywacja mechanizmów cytoplazmatycznych, zależna głównie od uruchomienia kaskadowych reakcji kaspaz, aktywacji białek p53, cytochromu C. W końcowym etapie PSK, dochodzi do ukierunkowanej destrukcji kwasów nukleinowych. Uszkodzenie kwasów nukleinowych zapoczątkowuje zmiany morfotyczne komórki i jej śmierć (2, 17).

Wpływ inwazji pasożytniczych na apoptozę

Choroby wywoływane przez pierwotniaki zależą w dużym stopniu od lokalizacji tych pasożytów wewnątrz komórki lub przestrzeni międzykomórkowej. Zróżnicowana lokalizacja tych pasożytów wpływa na odmienne procesy obrony immunologicznej organizmu, a w konsekwencji na przebieg choroby.

Pełzaki lokalizują się w przestrzeniach międzykomórkowych. Pierwotniaki te syntetyzują czynniki uszkadzające wybrane komórki. Ponadto ich obecność powoduje wystąpienie odczynów zapalnych, angażujących liczne komórki fagocytarne. W zależności od umiejscowienia oraz rodzaju pełzaków procesy chorobowe mogą znacznie różnić się, pomimo podobieństwa patogenów poszczególnych chorób. Zarażenie *E. histolytica* jest odpowiedzialne za uszkodzenia jelita grubego oraz wątroby i płuc. W zarażeniu *E. histolytica*, Boettner i Petri (1) przedstawili dynamiczny rozwój uszkodzenia komórek śluzówki jelit oraz tkanki wątrobowej. W początkowym okresie dochodzi do przylegania pasożytów do komórek, następnie cytolyzy tych komórek i fagocytozy. W okresie tym następuje pobudzenie receptorów śmierci uruchamiających mechanizm PSK. Procesy fagocytozy i PSK przebiegają równolegle. W procesach fagocytozy trofozoitów *E. histolytica* neutrofile pełnią ważną rolę. Badania Sima i wsp. (23) wykazały utrzymywanie się zdolności pobudzania PSK przez *E. histolytica*, po jej wchłonięciu do neutrofile. W komórkach tych pełzaki aktywują przemiany energetyczne, powodując wyzwolenie syntetyzowanego aktywnego tlenu. Tlen jest czynnikiem pobudzającym efektorowe czynniki PSK. Liczba neutrofile ulega zmniejszeniu. Podobnie w badaniach Nasirudeena i Tan (15) wykazano nasilenie PSK w neutrofilach przez pełzaki i w efekcie hamowanie ich aktywności fagocytarnej. Pochłonięte przez neutrofile *Blastocystis hominis* stymulowały mitochondria do syntezy czynników inicjujących PSK. Ci sami badacze (16) stwierdzili nasilenie PSK w neutrofilach w czasie terapii parazytoz metronidazolem. Niektóre pełzaki mogą stymulować procesy PSK w komórkach budujących narząd. Zheng i wsp. (29) wskazują na uszkodzenia komórek epitelialnych rogówki w inwazjach pełzakami *Acanthamoeba sp.* Uszkodzenie tych komórek wynika głównie z PSK, a nie procesów martwiczo-zapalnych.

Giardia lamblia jest kosmopolitycznym wiciowcem, odpowiedzialnym za zapalenia pęcherzyka i dróg żółciowych, jelita cienkiego, żołądka, zatok obocznych nosa, zespół złego wchłaniania i występowania różnopostaciowych odczynów alergicznych. Badania China i wsp. (4) wykazały, że w przebiegu tej parazytozy uszkodzenie enterocytów i komórek wyściełających ściany dróg żółciowych zależy w dużym stopniu od aktywacji w nich PSK. Objawy choroby są efektem niszczenia komórek w procesach programowanej śmierci, jak i odczynów zapalnych. *Giardia* pobudza

błonowe receptory śmierci, które uruchamiają kaskadową reakcję kaspaz. Reakcje te zapoczątkowuje aktywacja kaspazy 3. Proces można zahamować podając inhibitor kaspazy 3.

W zarażeniu wiciowcem, *Trichomonas vaginalis*, Sommer i wsp. (24) obserwowali ginienie komórek epitelialnych w wyniku PSK. *T. vaginalis* pobudza syntezę proteazy cysteinowej będącej inicjatorem reakcji PSK. W badaniach doświadczalnych wykazano również hamowanie białek Bcl-2 i Bcl-x przez *T. vaginalis*. Białka te są supresyjnymi modulatorami PSK. *T. vaginalis* stymuluje nie tylko komórki epitelialne do PSK, ale również neutrofile. Działanie takie znacznie ogranicza możliwości obrony ustroju w tym zarażeniu.

Leiszmanioza jest wywoływana przez wiciowce, a objawia się uszkodzeniami narządowymi, uogólnionymi lub zmianami miejscowymi, dotyczącymi skóry i błon śluzowych. Rezerwuarem *Leishmania sp.* są zwierzęta dzikie i domowe, a przenosicielem pasożyta są moskity z rodzaju *Phlebotomus*. Zmiany skórne związane z zarażeniem, charakteryzują się obecnością guzkowatych nacieków, powiększających się z tendencją do przekształcania w owrzodzenia. Powstające owrzodzenia cechują się obecnością ogniskowej martwicy mokrej lub suchej, otoczonej twardym, zapalnym wyniesieniem. W zarażeniu tym pasożytem, procesy PSK odgrywają ważną rolę w wystąpieniu i utrzymywaniu się objawów chorobowych. Wydaje się, że zmiany skórne w tej chorobie związane są głównie z aktywacją programowanej śmierci komórek epidermalnych (7). W zmienionej chorobowo tkance skórnej, a szczególnie w powstających owrzodzeniach, stwierdza się wysokie stężenie białek Fas i FasL. Wskazuje to na aktywację błonowych receptorów PSK inicjujących dalsze etapy tego procesu w komórce. Ribeiro-Gomes i wsp. (20) wykazali nasilenie ekspresji FasL na fagocytach przez pierwotniaki *Leishmania sp.* Pobudzenie ekspresji Fas i FasL na fagocytach wpływa na wzajemne niszczenie komórek. W zarażeniu *Leishmania sp.* bardzo często dochodzi do aktywacji procesów PSK w makrofagach. Nie tylko w makrofagach dochodzi do aktywacji PSK. Badania Lisi i wsp. (13) wykazały, że *L. infatu* pobudza syntezę aktynomycyny, która inicjuje PSK w monocytach. Długotrwałe zarażenie *Leishmania sp.* powoduje hamowanie ekspresji białek pasożyta na komórkach, co skutkuje zmniejszeniem niszczenia tych komórek w odczynach zapalnych. Hamowanie procesów PSK Verma i Dey (28) obserwowali w przebiegu zarażenia *L. donovani*, pierwotniaka odpowiedzialnego za narządową postać leiszmaniozy. Być może, to jest przyczyną przewlekania się procesu chorobowego. Dodanie do komórek zarażonych pasożytem alkil-fosfocholiny (miltefosine), stymulatora PSK, powoduje szybkie ich zniszczenie. Poszukując nowych możliwości terapeutycznych leiszmaniozy, Holzmuller i wsp. (11) stwierdzili, że interferony oraz preparaty stymulujące wzrost stęże-

nia NO w komórkach zwiększają aktywność PSK, wpływając na eliminację komórek zarażonych. Procesy PSK w zarażeniach pasożytniczych są niewystarczająco poznane. Prawdopodobnie na ich aktywność wpływa rodzaj stymulowanych przez pierwotniaka komórek oraz okres choroby. Przykładem tak zróżnicowanego wpływu pierwotniaków na procesy PSK jest wzmożona PSK w komórkach serca, a w efekcie zaburzeń kardiologicznych, jako działania wiciowca, *Trypanosoma cruzi*, czynnika etiologicznego choroby Chagasa (25).

Aktualnie zimnica spowodowana jest najczęściej zarodźcami *Plasmodium falciparum* i *P. vivax*. Niższa parazytemia w zarażeniach *P. falciparum* w porównaniu do zarażeń *P. vivax* nie koreluje z ciężkością procesu chorobowego. Wydaje się, że proces chorobowy jest w dużym stopniu uwarunkowany zróżnicowanym wpływem tych zarodźców na PSK. Badania Hemmera i wsp. (10) wskazały na dużą aktywację procesów programowanej śmierci w komórkach epitelialnych wskutek działania na nie zarodźców *P. falciparum*. W rozwoju powikłań chorobowych, prawdopodobną przyczyną jest niszczenie komórek ośrodkowego układu nerwowego (OUN), nerek, płuc lub szpiku kostnego wskutek toczących się w nich PSK. Van de Sand i wsp. (27), w przeprowadzonych badaniach doświadczalnych wykazali odmienne od dotychczas opisywanego, hamujące działanie *P. berghei* na procesy programowanej śmierci komórek. Dopiero po podaniu TNF, dochodziło w tych komórkach do gwałtownie przebiegającej PSK.

Toksoplazmoza jest chorobą odzwierzęcą rozpowszechnioną na całym świecie. Parazytoza ta jest szczególnie niebezpieczna u ciężarnych i chorych z niedoborami immunologicznymi. Wśród chorych z deficytem immunologicznym zarażenie *Toxoplasma gondii* powoduje zmiany zapalne lub ogniskowe w OUN, płucach, wątrobie. W nabytej postaci tej choroby, w fazie ostrej zarażenia, w limfocytach T i innych komórkach fagocytarnych dochodzi do aktywacji PSK. Śmierć tych komórek zmniejsza możliwości skutecznej obrony immunologicznej wynikającej z aktywności fagocytarnej (5).

Peng i wsp. (18) w badaniach nad glistą ludzką wykazali, że przesącz uzyskany z drugiej generacji larw *Ascaris lumbricoides* pobudza PSK w komórkach pęcherzyków płucnych. Badania te podważają dotychczasową definicję powstawania nacieków Löfflera w płucach chorych zarażonych glistnicą. Nacieki, uznawane za przejściowy stan zapalny wynikający z wędrówki larw, mogą być związane z reakcjami PSK, a nie odczynem zapalnym.

Badania przeprowadzone przez Jensona i wsp. (12) wykazały, że mikrofilarie *Brugia pahangi* pobudzają PSK w limfocytach T CD4+. Proces ten jest uzależniony od wzmożonej syntezy w tych komórkach IFN- γ i NO. Eliminacja limfocytów wskutek PSK zmniejsza działania obronne skierowane przeciwko

filariom, wpływając na utrzymanie się przewlekłego stanu zapalnego. W badaniach doświadczalnych Krishnamoorthy i wsp. (14) wykazali, że mikrofilarie mogą pobudzać PSK w komórkach epitelialnych poprzez hamowanie syntezy modulatorów, takich jak Bcl-2.

Wu i wsp. (26) obserwowali wzrost aktywności PSK w mięśniach poprzecznie prążkowanych w zarażeniu *Trichinella spiralis*. Pasożyt ten wpływał początkowo na aktywację receptorów TNF-alfa, które pobudzały aktywność kaspazy 3 i 8. W toku badań stwierdzano podwyższoną aktywność procesów PSK w okresie otorbiana się pasożyta. Po zakończeniu tego procesu, aktywność PSK wracała do stanu podstawowego. Wykazano, że w zarażeniu *T. spiralis* rolę w pobudzeniu PSK odgrywają Apaf-1, kaspaza 9 i kinaza serynowo/treoninowa (9, 19). Tasiemczyce mogą powodować aktywację programowanej śmierci w komórkach jelitowych (6). Znacznie poważniejsze uszkodzenia może powodować wągryca. Badania nad cysticerkozą dowiodły istotnej roli PSK w patogenezie tej choroby. Pasożyt wydziela substancję stymulującą PSK w neutrofilach (3) i komórkach sąsiadujących z rozwijającym się pasożytem. Wydaje się, że w przebiegu tasiemczycy dochodzi do niszczenia elementów układu odpornościowego poprzez aktywowanie w nich programowanej śmierci.

Pasożyty pobudzają programowaną śmierć komórek gospodarza, ale również procesy PSK mogą uszkadzać samego pasożyta. Badania Flores-Pereza i wsp. (8) wykazały, że promieniowanie gamma niszczy cysticerkoidy w mięsie wieprzowym na skutek aktywacji w nich PSK. Jest to doskonały sposób zapobiegania rozprzestrzenianiu tej parazytozy z wykorzystaniem zjawiska PSK.

W ostrym okresie zarażenia *Schistosoma japonicum*, podobnie jak w cysticerkozie obserwuje się wzrost programowanej śmierci neutrofilii. Rumbley i wsp. (22) wskazują na istotne znaczenie PSK w patogenezie zmian chorobowych wywoływanych w zarażeniu *Schistosoma mansoni*. Czynnikiem pobudzającym ten proces są fragmenty otoczki pasożyta, które aktywują receptory Fas, FasL oraz modulatory programowanej śmierci Bcl-2, Bcl-xL, i Bax. Nieprawidłowości w procesach programowanej śmierci w zarażeniach *Schistosoma mansoni* są jedną z głównych przyczyn powstawania nowotworów jelit i pęcherza moczowego.

Wpływ parazytoz na procesy programowanej śmierci komórek gospodarza to nowy kierunek badań. Wydaje się, że podjęcie tego tematu jest istotne zarówno w lepszym zrozumieniu patogenezy chorób pasożytniczych, jak i wprowadzeniu nowych metod terapeutycznych.

Piśmiennictwo

1. Boettner D. R., Petri W. A.: Entamoeba histolytica activates host cell caspases during contact-dependent cell killing. Curr. Top. Microbiol. Immunol. 2005, 289, 175-184.

2. Boratyński Z., Fliieger S., Pedrycz A., Wieczorski M.: Apoptosis in rat hepatocytes – histological, ultrastructural and immunohistochemical assessment. *Medycyna Wet.* 2005, 61, 1420-1424.
3. Chaible L. M., Alba-Loureiro T. C., Maia A. A., Pugine S. M., Valle C. R., Pithon-Curi T. C., Curi R., De Melo M. P.: Effect of *Cysticercus cellulosae* on neutrophil function and death. *Vet. Parasitol.* 2005, 127, 121-129.
4. Chin A. C., Teoh D. A., Scott K. G., Meddings J. B., Macnaughton W. K., Buret A. G.: Strain-dependent induction of enterocyte apoptosis by *Giardia lamblia* disrupts epithelial barrier function in a caspase-3-dependent manner. *Infect. Immun.* 2002, 70, 3673-3680.
5. Długońska H.: Molecular modifications of host cells by *Toxoplasma gondii*. *Pol. J. Microbiol.* 2004, 53 (Suppl 1), 45-54.
6. Donskow K., Rzepecka J., Doligalska M.: Apoptoza w regulacji odpowiedzi immunologicznej u myszy zarażonych *Heligmosomoides polygyrus*. *Wiad. Parazytol.* 2004, 50, 519-522.
7. Eidsmo L., Nylen S., Khamesipour A., Hedblad M. A., Chiodi F., Akuffo H.: The contribution of the Fas/FasL apoptotic pathway in ulcer formation during *Leishmania major*-induced cutaneous Leishmaniasis. *Am. J. Pathol.* 2005, 166, 1099-1108.
8. Flores-Perez I., Fragoso Gonzalez G., Sciutto E., de Aluja A. S.: Apoptosis induced by gamma irradiation of *Taenia solium* metacestodes. *Parasitol. Res.* 2003, 90, 203-208.
9. Golińska Z. E.: Prevalence of new species of the genus *Trichinella* in animals and people. *Medycyna Wet.* 2003, 59, 568-570.
10. Hemmer C. J., Lehr H. A., Westphal K., Unverricht M., Kratzius M., Reisinger E. C.: *Plasmodium falciparum* Malaria: reduction of endothelial cell apoptosis in vitro. *Infect. Immun.* 2005, 73, 1764-1770.
11. Holzmüller P., Cavaleyra M., Moreaux J., Kovacic R., Vincendeau P., Papierok G., Lemesre J. L.: Lymphocytes of dogs immunised with purified excreted-secreted antigens of *Leishmania infantum* co-incubated with *Leishmania* infected macrophages produce INF gamma resulting in nitric oxide-mediated amastigote apoptosis. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2005, 106, 247-257.
12. Jenson J. S., O'Connor R., Osborne J., Devaney E.: Infection with *Brugia microfilariæ* induces apoptosis of CD4(+) T lymphocytes: a mechanism of immune unresponsiveness in filariasis. *Eur. J. Immunol.* 2002, 32, 858-867.
13. Lisi S., Acquafredda A., Spinelli R., Schiavone M., Mitolo V., Brandonisio O., Panaro M.: Infection with *Leishmania infantum* inhibits actinomycin D-induced apoptosis of human monocytic cell line U-937. *J. Eukaryot. Microbiol.* 2005, 52, 211-217.
14. Krishnamoorthy B., Renner W., Balakrishnan A.: Apoptosis induced by filarial parasitic sheath protein in Hep 2 cell lines blocked by ectopic expression of bcl 2. *Cell Biol. Int.* 1998, 22, 483-492.
15. Nasirudeen A. M., Tan K. S.: Programmed cell death in *Blastocystis hominis* occurs independently of caspase and mitochondrial pathways. *Biochimie* 2005, 87, 489-497.
16. Nasirudeen A. M., Hian Y. E., Singh M., Tan K. S.: Metronidazole induces programmed cell death in the protozoan parasite *Blastocystis hominis*. *Microbiology* 2004, 150, 33-43.
17. Neuman M. G.: Apoptosis in disease of the liver. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2001, 38, 109-166.
18. Peng G. H., Yuan K., Zhou X. M., Peng W. D.: The second stage larvae of *Ascaris lumbricoides*. *Zhongguo Ji Sheng Chong Xue Yu Ji Sheng Chong Bing Za Zhi* 2004, 22, 209-212.
19. Piekarska J., Obmińska-Mrukowicz B.: The influence of PHA-P on a level of apoptosis and necrosis in the course of the infection with *Trichinella spiralis*. *Wiad. Parazytol.* 2003, 49, 402-403.
20. Ribeiro-Gomes F. L., Moniz-de-Souza M. C., Borges V. M., Nunes M. P., Mantuano-Barradas M., D'Avila H., Bozza P. T., Calich V. L., DosReis G. A.: Turnover of neutrophils mediated by Fas ligand drives *Leishmania major* infection. *J. Infect. Dis.* 2005, 192, 1127-1134.
21. Rulka J., Kocki J.: Apoptosis: programmed death of cells in viral infections. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 902-905.
22. Rumbley C. A., Sugaya H., Zekavat S. A., Perrin P. J., Phillips S. M.: Elimination of lymphocytes, but not eosinophils, by Fas-mediated apoptosis in murine schistosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001, 65, 442-449.
23. Sim S., Yong T. S., Park S. J., Im K. I., Kong Y., Ryu J. S., Min D. Y., Shin M. H.: NADPH oxidase-derived reactive oxygen species-mediated activation of ERK1/2 is required for apoptosis of human neutrophils induced by *Entamoeba histolytica*. *J. Immunol.* 2005, 174, 4279-4288.
24. Sommer U., Costello C. E., Hayes G. R., Beach D. H., Gilbert R. O., Lucas J. J., Singh B. N.: Identification of *Trichomonas vaginalis* cysteine proteases that induce apoptosis in human vaginal epithelial cells. *J. Biol. Chem.* 2005, 280, 23853-23860.
25. Tostes S. Jr, Bertulucci Rocha-Rodrigues D., de Araujo Pereira G., Rodrigues V. Jr: Myocardocyte apoptosis in heart failure in chronic Chagas' disease. *Int. J. Cardiol.* 2005, 99, 233-237.
26. Wu Z., Nagano I., Boonmars T., Takahashi Y.: Tumor necrosis factor receptor-mediated apoptosis in *Trichinella spiralis*-infected muscle cells. *Parasitology* 2005, 131, 373-381.
27. van de Sand C., Horstmann S., Schmidt A., Sturm A., Bolte S., Krueger A., Lutgehetmann M., Pollok J. M., Libert C., Heussler V. T.: The liver stage of *Plasmodium berghei* inhibits host cell apoptosis. *Mol. Microbiol.* 2005, 58, 731-742.
28. Verma N. K., Dey C. S.: Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 3010-3015.
29. Zheng X., Uno T., Goto T., Zhang W., Hill J. M., Ohashi Y.: Pathogenic *Acanthamoeba* induces apoptosis of human corneal epithelial cells. *Jpn. J. Ophthalmol.* 2004, 48, 23-29.

Adres autora: dr n med. Tadeusz Wojciech Łapiński, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok; e-mail: twlapinski@poczta.onet.pl