

Współdziałanie lizozymu, białka C-reaktywnego i ceruloplazminy w procesach obronnych ssących prosiąt

KRYSTYNA ŻYCZKO, TADEUSZ BAKUŁA*

Katedra Genetyki Zwierząt Wydziału Bioinżynierii Zwierząt UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn
*Zespół Profilaktyki Weterynaryjnej i Higieny Pasz Katedry Weterynaryjnej Ochrony Zdrowia Publicznego
Wydziału Medycyny Weterynaryjnej UWM, ul. Oczapowskiego 13, 10-719 Olsztyn

Życzko K., Bakuła T.

Cooperative interactions among lysozyme, C-reactive protein and ceruloplasmin in the immune response of suckling piglets

Summary

The aim of the present study was to determine the cooperative interactions among some non-specific humoral factors participating in the immune response of healthy suckling piglets and piglets with diarrhea caused by *E. coli* at different ages. A total of 168 hybrid piglets (aged 12 to 18 days and 19 to 25 days), clinically healthy and suffering from diarrhea, were examined. The serum levels of lysozyme, ceruloplasmin (CP) and C-reactive protein (CRP) were determined in randomly selected sibs (clinically healthy piglets and piglets with diarrhea). Feces samples were taken from piglets with diarrhea to identify *E. coli* strains. A positive correlation between lysozyme activity and the serum concentration of CP was observed in healthy animals. This shows that over the experimental period the values of both these indices increased along parallel lines at a relatively stable CRP level. Elevated serum levels of lysozyme, CP and CRP in piglets with diarrhea caused by *E. coli*, as compared with healthy piglets, reflected the participation of these non-specific humoral factors in the immune response against *E. coli*. The increase in lysozyme activity, resulting from the immune response, was parallel to the increase in CP concentration (a positive correlation), but not parallel to the increase in CRP concentration (a negative correlation). These changes were found to be age-related. In younger piglets, the lysozyme activity was significantly correlated with CRP level but in older ones with level of CP.

Keywords: piglets, lysozyme, C-reactive protein, ceruloplasmin

Prosięta w 2.-3. tygodniu życia są szczególnie narażone na chorobotwórcze działanie patogenów. W tym okresie zanika już nabyta przez nie odporność siarowa, zaś rozwój ich własnych mechanizmów obronnych – nieswoistych (nieimmunologicznych) i swoistych (immunologicznych) nie jest jeszcze dostateczny (22, 31). Ten niekorzystny stan odporności ogólnej predysponuje prosięta do zakażeń, w tym patogennymi szczepami *Escherichia coli* przyczyniającymi się do wystąpienia biegunki.

Stymulowane wpływem patogenów mechanizmy obronne wyzwalają serię reakcji, tworzących stan zapalny. W pierwszej jego fazie uczestniczą głównie nieswoiste elementy komórkowe, rozpoznające i niszczące patogeny w procesach: fagocytozy, cytolizy i cytotoxyczności (1, 10). Ich funkcje wspomagają nieswoiste elementy humoralne, obecne w surowicy krwi oraz płynach i wydzielinach ustrojowych (10, 15, 21, 27). Należą do nich m.in.: lizozym oraz tzw. białko ostrej fazy – bof, w tym ceruloplazmina (CP) i białko C-reaktywne (CRP).

Lizozym, dzięki enzymatycznym właściwościom przynależnym beta-(1,4)-N-acetylmuramidazom, hydrolizuje wiązania glikozydowe związków tworzących ścianę komórki bakteryjnej. Prowadzi to do jej lizy, drogą bezpośrednią, tj. po uwolnieniu patogenu z makrofagów (2), bądź pośrednią, stymulując fagocytozę (15). Może również degradować komórki bakteryjne w sposób nieenzymatyczny, tj. poprzez ich adhezję i agregację (21). Lizozym przejawia także działanie bakteriostatyczne oraz przeciwzapalne. Neutralizuje kwaśne mediatory zapalenia, zabezpieczając ustrój przed stresem oksydacyjnym (13).

Miejscowym procesom zapalnym towarzyszy ogólnoustrojowa reakcja zwana odpowiedzią ostrej fazy, kontrolowana przez oś podwzgórzowo-przysadkowo-nadnerczową. Celem jej jest ograniczenie odczynu zapalnego i usunięcie czynnika uszkodzającego (16, 20). W tych złożonych procesach uczestniczą m.in. CRP i CP.

Białko C-reaktywne (o pentametrycznej strukturze) rozpoznaje patogeny, wiążąc reszty fosfocholiny,

wchodzącej w skład ich otoczki oraz uczestniczy w ich eliminacji. Zachodzi ona przy udziale dopełniacza, aktywowanego (drogą klasyczną) przez to białko. Czynniki te współdziałają również w chemotaksji, poprzedzającej fagocytozę. Właściwości opsonizujące CRP wspomagają fagocytozę, zaś pro- i przeciwzapalne – regulują wybuch tlenowy w neutrofilach (20, 27, 28).

Przeciwzapalne działanie wykazuje także ceruloplazmina – glikoproteina wiążąca miedź. Opiera się ono na jej ferroksozydazowych właściwościach, przejawiających się również w metabolizmie żelaza (7). Dzięki nim zdolna jest do usuwania (14) bądź degradowania (5) wolnych rodników tlenowych, niwelując ich toksyczny nadmiar. Ponadto wzmacnia i moduluje chemotaksję poprzez wiązanie się z monocytami i makrofagami (26).

Celem badań było określenie współdziałania wybranych nieswoistych elementów humoralnych w obronności prosiąt zdrowych i z biegunką na tle *E. coli*, w zależności od ich wieku.

Materiał i metody

Przebadano 168 prosiąt ssących, po lochach mieszańcach ras wielka biała polska × polska biała zwisłoucha i knurach rasy duroc, utrzymywanych w fermie tuczu trzody chlewnej. Lochy, zgodnie z instrukcją, immunizowano szczepionką Porcilis coli (produkcji Interwet). Wybrano losowo 42 mioty, w których część prosiąt była klinicznie zdrowa, a część wykazywała biegunkę. Rodzeństwo dobierano losowo, proporcjonalnie do częstości występowania biegunki i wielkości miotu. Wybrane prosięta podzielono na młodsze (od 12. do 18. dnia życia) i starsze (od 19. do 25. dnia życia). Od zdrowych – młodszych (n = 63) i starszych (n = 25) oraz prosiąt z biegunką (odpowiednio n = 54 i n = 26), pobrano krew z żyły czczej przedniej. W surowicy krwi oznaczono aktywność lizozymu – metodą turbidymetryczną wg Smolelisa i Hartsella (cyt. 24) i wyrażono ją w procentach lizy *Micrococcus lysodeicticus*. Poziom białka C-reaktywnego ustalono (w specjalistycznym laboratorium) – metodą immunoturbidymetryczną w analizatorze Roche-Hitachi 912, używając monoklonalnych przeciwciał przeciwko ludzkiej CRP (nr kitu 03002012) i ludzkich standardów wg instrukcji producenta. Poziom ceruloplazminy oznaczono metodą Houchina (cyt. 29).

Od prosiąt z biegunką pobrano wymazy kału (z odbytu) i w specjalistycznej placówce, badano je w kierunku obecności szczepów *E. coli*. W tym celu stosowano agar z 5% dodatkiem krwi baraniej, podłoża: Mc Conkeya, Kliglera i Christense-na, testy na wytwarzanie indolu i rozkład laktozy.

Statystyczną analizę poprzedzała transformacja logarymiczna uzyskanych wyników CRP. Wartość badanych wskaźników wyrażono za pomocą średniej arytmetycznej (\bar{x}) i odchylenia standardowego (s). Do oceny wpływu stanu zdrowia i wieku

badanych prosiąt na poziom oznaczanych wskaźników zastosowano dwuczynnikową analizę wariancji w układzie nieortogonalnym. Współzależność między wartością analizowanych parametrów wyrażono za pomocą współczynników korelacji prostej (r).

Wyniki i omówienie

Analizę porównawczą poziomu oznaczanych parametrów surowicy krwi prosiąt zdrowych i z biegunką na tle *E. coli* przedstawiono w tab. 1.

Aktywność lizozymu oraz poziom CP modyfikował wiek badanych prosiąt, niezależnie od ich stanu zdrowia. Młodsze względem starszych wykazywały niższą wartość tych wskaźników ($p \leq 0,01$, tab. 1), korespondującą z wynikami innych autorów (9, 22, 31). Powyższe zróżnicowanie jest efektem wzrostu aktywności lizozymu (22, 31) i poziomu CP (9), postępującego wraz z wiekiem prosiąt. Nie stwierdzono wpływu wieku badanych prosiąt na poziom CRP. Wartość tego parametru (niezależnie od stanu zdrowia prosiąt) wykazywała dużą zmienność osobniczą, obserwowaną również przez innych autorów (3, 6, 25). Kostro i wsp. (17) wskazują na związek między stężeniem CRP i lizozymu (w surowicy krwi prosiąt ssących) a stanem gospodarki żelazem. Przy niedoborze tego pierwiastka (wskutek niedokrwistości fizjologicznej) poziom tych parametrów wzrasta, co świadczy o pobudzeniu układu immunologicznego.

Wykazano podwyższenie poziomu oznaczonych parametrów w surowicy krwi prosiąt z biegunką na tle *E. coli* względem zdrowych ($p \leq 0,01$, tab. 1), przy czym różnica ta zależna była od wieku. Aktywność lizozymu, poziom CP i CRP u młodszych z biegunką

Tab. 1. Poziom wskaźników surowicy krwi prosiąt zdrowych i z biegunką na tle *E. coli* w zależności od wieku zwierząt ($\bar{x} \pm s$)

Wskaźniki	Wiek prosiąt	Prosięta		Źródła zmienności		
		zdrowe	z biegunką	S	W	S × W
Lizozym % lizy	młodsze	23,11 6,597	27,91 7,976			
	starsze	33,63 11,225	37,15 10,319			
	razem	26,12 9,451	30,92 9,801	**	**	-
Białko C-reaktywne mg/l (log)	młodsze	12,21 (0,905) 9,127 (0,4254)	21,24 (1,236) 13,090 (0,3313)			
	starsze	11,64 (0,899) 7,913 (0,4433)	20,15 (1,218) 12,029 (0,2651)			
	razem	12,04 (0,904) 8,803 (0,4306)	20,51 (1,230) 13,355 (0,3115)	**	-	-
Ceruloplazmina mg/100 ml	młodsze	23,84 6,387	30,64 9,903			
	starsze	33,59 12,852	37,47 11,491			
	razem	26,61 9,772	32,86 10,926	**	**	-

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$; ** – $p \leq 0,01$; S – stan zdrowia prosiąt; W – wiek; interakcja: stan zdrowia × wiek

(względem zdrowych) wzrósł o ok.: 20, 30 i 74%, zaś u starszych odpowiednio o ok.: 10, 11, 70%. Wzrost poziomu powyższych parametrów jest następstwem zmian w tempie ich syntezy, wskutek wystąpienia złożonej odpowiedzi obronnej skierowanej przeciw *E. coli*.

Synteza surowiczego lizozymu zachodzi głównie w strukturach lizosomalnych monocytów i makrofagów (21). Aktywacja makrofagów następuje po kilku godzinach od zadziałania indukującego bodźca. Najefektywniejsza jest po ok. 10 godz., zaś po 24 przemija. Proces ten w makrofagach nasila ekspresję enzymów i innych czynników obronnych, wydzielanych do osocza (11). Zdaniem Odinka i wsp. (23), aktywność lizozymu wzrasta przy ostrym stanie zapalnym, zaś maleje przy chronicznym. Inni autorzy (1) nie stwierdzili zmian w aktywności lizozymu po dożylnym podaniu endotoksyny *E. coli* prosiętom.

Działanie lizozymu w stanie zapalnym zależy od warunków środowiska, w jakich toczy się ten proces. W środowisku kwaśnym jego stabilność jest wyższa niż w zasadowym. Istotny wpływ na jego funkcję wywiera również siła jonowa. Przy niższej, liza przebiega szybciej niż przy wyższej (30).

Bakteriolityczne działanie lizozymu na bakterie Gram-ujemne (w tym *E. coli*) zachodzi przy wspierającym udziale m.in. układu dopełniacza wraz z beta lizynami bądź z przeciwciałami. Czynniki te ułatwiają hydrolizę względnie odpornej na lizozym lipopolisacharydowej otoczki, obecnej na powierzchni tych bakterii (21).

Synteza bof (m.in. CRP i CP) zachodzi głównie w hepatocytach. Indukują ją zasadniczo interleukiny IL-1 i IL-6, wyzwalane m.in. przez monocyty i makrofagi. Cytokiny te uzyskują maksymalną aktywność odpowiednio po 3 i 8 godz. od zadziałania bodźca, mając swój udział w ogólnoustrojowej reakcji obronnej, tj. w odpowiedzi ostrej fazy (4). Podczas jej przebiegu modyfikowana jest transkrypcja genów kodujących bof i ich synteza, przejawiająca się wzrostem lub spadkiem stężenia bof w surowicy krwi (16). Wzrost poziomu CRP w surowicy krwi jest charakterystyczną reakcją tzw. pozytywnych bof. Postępuje on dość szybko, tj. po ok. 6-8 godz. po zadziałaniu bodźca, co cechuje tzw. bof I rzutu. Po ok. 24-48 godz. osiąga on maksymalną wartość (8, 18).

CRP jest bardzo czułym, ale jednocześnie mało specyficznym wskaźnikiem infekcji bakteryjnych, prowadzących do biegunki (6). Zdaniem Bürgera i wsp. (6), jego średnia wartość w surowicy krwi prosiąt z biegunką wynosi 20,9 mg/l (u zdrowych – $9,0 \pm 6,1$ mg/l). Własne wyniki (tab. 1) korespondują z powyższymi i z podawanymi przez Bigoszewskiego (3), lecz są nieco niższe od stwierdzanych przez innych autorów (25).

Do pozytywnych bof zalicza się również ceruloplazminę. Jej stężenie (w przeciwieństwie do CRP) wzrasta wolno, co jest typowe dla bof II rzutu. Wzrost poziomu CP w osoczu świń (otrzymujących terpentynę), następuje dopiero 2. dnia od momentu iniekcji, zaś 4. dnia osiąga maksymalną wartość (8). Zmiana poziomu CRP i CP (jak też i innych bof) oraz czas wystąpienia reakcji ostrej fazy zależą m.in. od charakteru indukującego bodźca, czynników genetycznych, wieku i niedoboru białka (19).

Analizę przedstawioną w tab. 1 uzupełniono, określając współzależności między poziomami oznaczanych parametrów (tab. 2). Wzrost aktywności lizozymu i poziomu CP w okresie życia badanych prosiąt (tab. 1) przebiega równolegle. Świadczy o tym dodatnie skorelowanie powyższych wskaźników w surowicy krwi zdrowych prosiąt, młodszych i starszych ($p \leq 0,05$, tab. 2). Uzyskane wyniki korespondują z rezultatami badań innych autorów, charakteryzujących tempo zmiany tych parametrów. Ich zdaniem, między 7. a 21. dniem życia prosiąt poziom obu parametrów wzrasta umiarkowanie (9, 22). Natomiast między 21. a 35. dniem wzrost aktywności lizozymu jest dynamiczny (22), zaś poziomu CP nadal umiarkowany (9).

Brak związku między poziomem CRP a wiekiem badanych prosiąt (tab. 1), potwierdzają statystycznie nieistotne wartości r między stężeniem CRP a CP oraz CRP i aktywnością lizozymu w surowicy krwi zdrowych prosiąt (tab. 2). Prawdopodobnie w okresie życia badanych prosiąt, poziom CRP wykazywał względną stabilizację. Według Johanssona i wsp. (12) poziom CRP między 1. a 5. tyg. życia prosiąt nie ulega zmianie. Natomiast Bigoszewski (3) wskazuje na tendencję do jego spadku między 7. a 21. dniem życia, zaś Rychlik i wsp. (25) na wzrost w powyższym okresie życia.

W surowicy krwi prosiąt z biegunką stwierdzono dodatnią korelację między aktywnością lizozymu a poziomem CP (statystycznie nieistotną u młodszych i istotną u starszych) oraz ujemną – między aktywnością lizozymu a poziomem CRP ($p \leq 0,01$ u młodszych i nieistotną u starszych, tab. 2). Wyniki te wskazują na zmianę poziomu badanych parametrów wsku-

Tab. 2. Współzależność między poziomem badanych wskaźników surowicy krwi prosiąt, różniących się stanem zdrowia i wiekiem

Badane cechy	Wartość współczynników korelacji (r) między badanymi cechami					
	prosięta zdrowe			prosięta z biegunką		
	młodsze n = 63	starsze n = 25	razem n = 88	młodsze n = 54	starsze n = 26	razem n = 80
Lizozym i ceruloplazmina	0,262*	0,452*	0,511**	0,150	0,392*	0,308**
Lizozym i białko C-reaktywne	0,245	0,038	0,131	-0,531**	-0,039	-0,336**
Ceruloplazmina i białko C-reaktywne	0,198	-0,228	0,002	-0,064	-0,285	-0,133

Objaśnienia: * – $p \leq 0,05$, ** – $p \leq 0,01$

tek odpowiedzi obronnej, modyfikowanej wiekiem prosiąt. U młodszych zmiana aktywności lizozymu nie podążała za zmianą aktywności CRP, zaś u starszych aktywność lizozymu zmieniała się wraz z poziomem CP. Korelacja między poziomem CRP a CP okazała się statystycznie nieistotna (tab. 2). Przyczyny upatruje się w szybszej reaktywności CRP niż CP w odpowiedzi ostrej fazy.

Podsumowanie

Współzależność między aktywnością lizozymu a stężeniem CP w surowicy krwi zdrowych prosiąt wskazuje na równoległy wzrost poziomu powyższych czynników obronnych w okresie życia badanych prosiąt. Zmiana ta zachodziła przy względnie stałym stężeniu CRP.

Podwyższenie aktywności lizozymu oraz poziomu CRP i CP w surowicy krwi prosiąt z biegunką (na tle *E. coli*) w porównaniu do zdrowych jest przejawem zaangażowania tych nieswoistych elementów humoralnych w odpowiedzi obronnej, skierowanej przeciw *E. coli*. Wzrost aktywności lizozymu i stężenia CP (wskutek odpowiedzi obronnej) przebiegał równoległe, lecz nie w porównaniu do wzrostu stężenia CRP. Zmiany te wykazywały związek z wiekiem badanych prosiąt. U młodszych aktywność lizozymu istotnie korelowała z poziomem CRP, zaś u starszych z poziomem CP.

Piśmiennictwo

1. *Andonova M., Borissov J., Sotirov L.*: Changes in some factors of the innate immunity and serum zinc and iron concentrations in pigs following intravenous administration of *Escherichia coli* lipopolysaccharide. *Onderstepoort J. Vet. Res.* 2001, 68, 91-99.
2. *Biggar W. D., Sturgess J. M.*: Role of lysozyme in microbicidal activity of rat alveolar macrophages. *Infect. Immun.* 1977, 16, 974-982.
3. *Bigoszewski M.*: Przydatność diagnostyczna niektórych białek ostrej fazy u prosiąt. Praca dokt., Wydz. Med. Wet. UWM, Olsztyn 2003.
4. *Bigoszewski M., Rychlik A., Depta A.*: Białka ostrej fazy u zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 151-155.
5. *Bunkler V. A.*: Free radicals, antioxidants and ageing. *Med. Labor. Sci.* 1992, 49, 299-312.
6. *Bürger W., Fennert M., Pohle M., Wesemeter H.*: C-reactive protein – a characteristic feature of health control in swine. *J. Vet. Med.* 1992, A39, 635-638.
7. *Cousin R. J.*: Absorption, transport and hepatic metabolism of copper and zinc: special reference to metallothionein and ceruloplasmin. *Phys. Rev.* 1985, 65, 238-307.
8. *Eckersall P. D., Saini P. K., Mc Comb C.*: The acute phase response of acid soluble glycoprotein, alpha-1-glycoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin and C-reactive protein, in the pig. *Vet. Immunol. Immunopath.* 1996, 51, 377-385.
9. *Gomez-Garcia G. G., Matrone G.*: Copper metabolism in the early postnatal period of the piglets. *J. Nutr.* 1967, 92, 237-244.
10. *Jain C. N.*: Physiology of blood with some comments on response to disease. *Int. J. Anim. Sci.* 1993, 8, 195-231.
11. *Jakóbiński M.*: Immunologia. PWN, Warszawa, s. 208.
12. *Johansson A., Pielberg G., Anderson L., Edfors Lilja I.*: Polymorphism at the porcine dominant white/kit influence coat colour and peripheral blood cell measures. *Anim. Genetics.* 2005, 36, 288-296.
13. *Kijowski J., Leśniewski G.*: Separation, polymer formation and antibacterial activity of lysozyme. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 1999, 49, 3-16.
14. *Kim J. G., Park S. Y., Kim K. C., Yum I. J.*: Thiol-linked peroxidase activity of human ceruloplasmin. *FEBS Lett.* 1998, 431, 473-475.
15. *Klockars M., Roberts P.*: Stimulation of phagocytosis by human lysozyme. *Acta Haematol.* 1976, 55, 289-295.
16. *Kostro K., Gliński Z., Wójcicka-Lorentowicz K., Krakowski L.*: Białka ostrej fazy jako markery chorób u zwierząt. *Medycyna Wet.* 2001, 57, 539-542.
17. *Kostro K., Krasucki W., Bednarek D., Wójcicka-Lorentowicz K., Orlicki L., Piech T., Madany J.*: Wpływ stosowania wybranych preparatów żelazowych na wskaźniki odporności nieswoistej oraz poziom białek ostrej fazy u prosiąt osesków. *Medycyna Wet.* 2004, 60, 1237-1242.
18. *Kostro K., Luft-Deptula D., Gliński Z., Miazga A.*: Rola białek ostrej fazy w patologii zwierząt. *Życie Wet.* 2003, 78, 19-25.
19. *Kostro K., Sobieska M., Wiktorowicz K., Wołoszyn S.*: Białka ostrej fazy u zwierząt – występowanie i charakterystyka. *Medycyna Wet.* 1996, 52, 152-155.
20. *Kostro K., Wójcicka-Lorentowicz K., Gliński Z., Krakowski L., Wrona Z.*: Białka ostrej fazy jako ligandy komórek układu immunologicznego. *Medycyna Wet.* 2002, 58, 929-933.
21. *Kowalska M., Rzedzicki J.*: Funkcje lizozymu w organizmie. *Medycyna Wet.* 1988, 12, 707-711.
22. *Krakowski L., Krzyżanowski J., Wrona Z.*: Zmiany wybranych wskaźników nieswoistej odporności u prosiąt w okresie pourodzeniowym. *Medycyna Wet.* 1998, 54, 750-752.
23. *Odink J., Smeets J. F. M., Visser I. J. R., Sandman H., Snijders J. M. A.*: Hematological and clinicochemical profiles of healthy swine and swine with inflammatory processes. *J. Anim. Sci.* 1990, 68, 163-170.
24. *Pawelski S.*: Diagnostyka laboratoryjna w hematologii. PZWIL, Warszawa 1983, 523-524.
25. *Rychlik A., Bigoszewski M., Depta A., Kander M., Majewski M.*: Effect of diarrhea on the level of C-reactive protein (CRP) albumins and alpha, globulins in the blood serum of piglets. *Bull. Vet. Inst. Puławy* 2001, 45, 219-226.
26. *Saenko E. L., Skorobogatko O. V., Tarasenko P., Romasho V., Zhuravetz L., Zadroznaja L., Senjuk O. F., Yeroplov A. I.*: Modulatory effects of ceruloplasmin on lymphocytes, neutrophils and monocytes of patients with altered immune status. *Immunol. Invest.* 1994, 23, 2, 99-114.
27. *Szalai A. J.*: The biological functions of C-reactive protein. *Vasc. Pharmacol.* 2002, 39, 105-107.
28. *Szalai A. J., Agrawal A., Greenhough T. J., Volanakis J. E.*: C-reactive protein: structural, biology and host defense function. *Clin. Chem. Lab. Med.* 1999, 37, 265-270.
29. *Szczeklik E.*: Enzymologia kliniczna. PZWL, Warszawa 1974, 227-228.
30. *Wernicki A., Rzedzicki J.*: Nieswoiste humorale czynniki obronne wydzielin gruczołu mlekowego przeżuwaczy. *Medycyna Wet.* 1989, 15, 599-602.
31. *Życzko K., Życzko G. M.*: Analysis of some factors conditioning lysozyme activity in blood serum of pigs. *Czech. J. Anim. Sci.* 1998, 43, 453-457.

Adres autora: dr hab. Krystyna Życzko, prof. UWM, ul. Oczapowskiego 5, 10-719 Olsztyn; e-mail: kgz@uwm.edu.pl