

Wirusy grypy ptaków – molekularne determinanty patogenności, lekooporności i adaptacji do organizmu gospodarza

KRZYSZTOF ŚMIETANKA, ZENON MINTA

Zakład Chorób Drobiu Państwowego Instytutu Weterynaryjnego – Państwowego Instytutu Badawczego,
Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy

Śmietanka K., Minta Z.

Avian influenza viruses: molecular determinants of pathogenicity, drug resistance and host adaptation

Summary

The paper reviews molecular markers and determinants associated with virulence, host adaptation and drug resistance in avian influenza viruses (AIV). The virulence of AIV is mostly dependant on the presence of multiple amino acids (mainly arginine and lysine) at the cleavage site of the haemagglutinin (HA) protein. The major factors contributing to host adaptation are also harbored within the HA protein: amino acids at positions 226 and 228 determine virus binding affinity to receptors present in cell membranes of birds or humans. It has been shown that pathogenicity and host adaptation are also dependant on the amino acid sequences of the polymerase complex (PB2-PB1-PA) and the most significant mutation (E627K in PB2) is related to the increased replication of the virus in mammalian cells. Molecular markers associated with an increased resistance to antiviral drugs are localized in neuraminidase (NA) and matrix (M) proteins. For example, a histidine to tyrosine substitution at position 274 of NA (H274Y) decreases viral susceptibility to neuraminidase inhibitors (e.g. oseltamivir), the most frequently used drugs in flu treatment. Monitoring of the molecular changes in the viral genome of AIV is very important from an epidemiological point of view and can be a valuable part of an early warning system.

Keywords: avian influenza virus, virulence, host adaptation, drug sensitivity

Wirusy grypy ptaków (avian influenza, AI) należą do rodziny *Orthomyxoviridae*, rodzaju *Influenzavirus A* i posiadają genom zbudowany z 8 segmentów RNA kodującego 11 białek. Należą do nich białka kompleksu polimerazy: PB2, PB1, PB1-F2 i PA, a ponadto hemaglutynina (HA), nukleoproteina (NP), neuraminidaza (NA), matriks M1, matriks M2 oraz białka niestrukturalne NS1 i NS2 (13, 14).

Wirusy AI cechują się dużą zmiennością genetyczną, wynikającą z podatności polimerazy na błędy przy tworzeniu nowych kopii RNA. Powstająca po każdym cyklu replikacyjnym populacja nowych wirusów nie jest więc genetycznie homogenna, lecz stanowi zbiór różniących się nieznacznie subpopulacji (tzw. *quasi species*), w której dominują wirusowe cząstki potomne najlepiej przystosowane do aktualnie panujących warunków. Jeśli warunki zewnętrzne ulegną zmianie, np. w organizmie poddanym terapii przeciwwirusowej, wówczas obecność w danej populacji wariantów genetycznych wirusa opornych na dany chemioterapeutyk skutkuje bardzo silną presją selekcyjną, w wy-

niku której po pewnym czasie mutant wirusa zaczyna dominować. Powstawanie nowych wariantów odbywa się najczęściej na drodze mutacji punktowych, insercji oraz rekombinacji. W odniesieniu do wirusów grypy ptaków zdefiniowano szereg markerów molekularnych i mechanizmów związanych z nabywaniem patogenności oraz adaptacją do organizmu gospodarza, a także pojawianiem się oporności na leki przeciwwirusowe. Dotyczą one różnych genów AIV, a ich rola i znaczenie są tematem niniejszego artykułu.

Hemaglutynina

Hemaglutynina (HA) jest głównym białkiem odpowiedzialnym za wirulencję wirusów grypy ptaków. W wyniku syntezy powstaje jako polipeptyd o długości 580-585 aminokwasów, a poza komórką ma formę niezakaźnego prekursora HA0. Cząstka wirusowa staje się infekcyjna dopiero w następstwie posttranslacyjnej modyfikacji HA0 polegającej na proteolizie na dwie podjednostki HA-1 i HA-2 (13). Proteoliza odbywa się w specyficznym regionie białka HA, zwanym miej-

scem cięcia (cleavage site). Wirusy AI podtypu H5 o niskiej patogenności posiadają zwykle sekwencję aminokwasów PQRETR/GLF, natomiast wirusy podtypu H7 – PEXPKXR/GLF (tab. 1) (13). Taka sekwencja miejsca cięcia sprawia, iż HA wirusów słabo patogennych (low pathogenic avian influenza, LPAI) może ulegać trawieniu wyłącznie przez trypsynę i ewentualnie enzymy trypsynopodobne, których aktywność ograniczona jest do układu pokarmowego i oddechowego. W związku z tym patogenne działanie wirusów LPAI sprowadza się w praktyce tylko do tych dwóch układów. Z kolei wirusy o wysokiej patogenności (highly pathogenic avian influenza, HPAI) posiadają w miejscu cięcia dodatkowe aminokwasy zasadowe (argininę lub lizynę), co czyni je podatnymi na działanie furyny i proteaz furynopodobnych, obecnych w całym organizmie. Wirusy HPAI cechuje więc pantropizm, a ich patogenne oddziaływanie w stosunku do większości narządów i tkanek organizmu jest przyczyną ciężkiego przebiegu klinicznego choroby, kończącego się zwykle zejściem śmiertelnym.

Zmiany prowadzące do wzrostu patogenności mogą mieć charakter mutacji punktowych, insercji lub rekombinacji. Wzrost wirulencji wywołany mutacją punktową miał miejsce w przypadku wirusa H5N2, który spowodował epidemię w USA (Pensylwania) w 1983 r. (9). Wirus HPAI powstał ze słabo patogennego prekursora, w którym w wyniku punktowej mutacji miejsce cięcia białka HA0 zmieniło swój profil z PQRETR/GLF na PQRKKR/GLF. Zastąpienie kwasu glutaminowego i treoniny (E i T) przez dwie cząsteczki lizyny (K) pociągnęło za sobą zmianę fenotypu wirusa, wyrażoną zwiększoną patogennością. Drugi mechanizm nabywania zjadliwości związany jest ze stopniową akumulacją insercji nukleotydowych prowadzących do powstania nowego kodonu. Choć omawiany mechanizm nie jest do końca poznany, w najbardziej spójny sposób wyjaśnia zmiany, jakie zaszły w przypadku wirusa A/turkey/Ontario/7732/66, w którym miejsce cięcia w nisko patogennym prekursorze zmieniło się z PQRETR/GLF na PQRKKR/GLF. Z kolei w Chile w 2002 r., a w Kanadzie w 2004 r. doszło do interesującej mutacji wirusa słabo patogennego do wysoce zjadliwego, polegającej na insercji fragmentu o długości 30 nukleotydów (Chile) i 21 nukleotydów (Kanada), powodującej wydłużenie miejsca cięcia, odpowiednio, o 10 i 7 aminokwasów. Insercje były wynikiem rekombinacji z fragmentem RNA genów NP i M, które w konsekwencji doprowadziły do zwiększenia liczby aminokwasów zasadowych (argininy – R lub lizyny – K) w miejscu cięcia HA (13).

Główne molekularne determinanty specyficzności gatunkowej wirusów grypy są również zlokalizowane w obrębie genu HA. Mechanizm adaptacji związany jest głównie z powinowactwem hemaglutyniny wirusa do receptorów błon komórkowych gospodarza, których najważniejszym składnikiem jest kwas sjałowy (kwas N-acetylneuraminowy, NeuAc). Wirusy grypy

Tab. 1. Skróty literowe aminokwasów wykorzystane w artykule

Aminokwas	Skrót jednoliterowy
Arginina	R
Asparagina	N
Kwas asparaginowy	D
Kwas glutaminowy	E
Glutamina	Q
Glicyna	G
Histydyna	H
Izoleucyna	I
Prolina	P
Leucyna	L
Lizyna	K
Seryna	S
Treonina	T
Tyrozyna	Y
Walina	V
Jakikolwiek aminokwas obojętny lub zasadowy	X

wiążą się z receptorami NeuAc w dwóch konformacjach: α -2,3 NeuAc oraz α -2,6 NeuAc. Wykazano jednak znaczące różnice w preferencji wirusów grypy ptaków i ludzi do wiązania się z poszczególnymi typami receptorów. Wirusy ptasie wykazują znacznie większe powinowactwo do α -2,3 NeuAc, występujących w przewodzie w nabłonku ptaków, podczas gdy wirusy typu ludzkiego wiążą się łatwiej z receptorami typu α -2,6, które dominują w błonach komórkowych u człowieka, szczególnie w górnych drogach oddechowych (w płucach występuje z kolei stosunkowo duża ilość receptorów α -2,3 NeuA). Powinowactwo hemaglutyniny do kwasu sjałowego w określonej konformacji zależy między innymi od obecności aminokwasów w pozycjach 226 i 228 białka HA (21). Hemaglutynina wirusów ptasich (z wyjątkiem wirusów AI podtypów H13 i H16 izolowanych od mew oraz niektórych AIV podtypu H9N2 stwierdzanych u drobiu w Azji) posiada w tych pozycjach glutaminę (Q) i glicynę (G), podczas gdy w hemaglutynie ludzkich wirusów stwierdza się serynę (S) i leucynę (L). Hemaglutynina wirusów grypy odpowiedzialnych za pandemię u ludzi w latach 1918 (H1N1), 1957 (H2N2) i 1968 (H3N2), pomimo ewolucyjnie ptasiego pochodzenia, posiadała powinowactwo do receptorów typu ludzkiego (α -2,6 NeuAc) i tym należy tłumaczyć ich zdolność do efektywnej transmisji pomiędzy ludźmi (10). Należy jednak podkreślić, iż izolowane od ludzi wirusy podtypu H9N2 posiadają w pozycji 226 leucynę, lecz pomimo to zachowują zdolność do zakażenia różnych gatunków ptaków, co sugeruje, że powinowactwo hemaglutyniny do poszczególnych typów receptorów nie jest niezbędnym czynnikiem warunkującym

jącym adaptację gatunkową, a tylko jej bardzo ważnym elementem.

Neuraminidaza

Główną rolą neuraminidazy (NA) jest niszczenie kwasu neuraminowego, co ułatwia przyłączanie się wirusa grypy do komórki. Ponadto poprzez odcinanie reszt kwasu sialowego NA umożliwia uwalnianie wirionów potomnych z komórki (14). Mutacje zlokalizowane w NA wirusów grypy ptaków mają zazwyczaj związek z adaptacją, nabywaniem oporności na niektóre chemioterapeutyki, a prawdopodobnie również z wirulencją. Wykazano np., iż większość wirusów HPAI H5N1 posiada delecję 19 lub 20 aminokwasów w NA, która może być związana z ich adaptacją do organizmu ptactwa domowego (głównie ptaków grzebiących), jak również ze wzrostem patogenności dla ssaków (11, 13, 16). Ponadto wykazano, że obecność dodatkowych miejsc glikozylacji w obrębie białka NA może prowadzić do wzrostu zjadliwości wirusów H5N1 dla drobiu (6). W obrębie neuraminidazy występują również markery oporności na leki przeciwwirusowe z grupy inhibitorów NA, do których należą oseltamivir i zanamivir. Potwierdzono, iż mutacja polegająca na zastąpieniu histydyny przez tyrozynę w pozycji 274 (H274Y) prowadzi do wzrostu oporności wirusów HPAI H5N1 na oseltamivir (8).

Kompleks polimerazy

Na kompleks polimerazy składają się cztery białka: PB2, PB1, PB1-F2 i PA, które kodowane są przez 3 geny. Białko PB2 inicjuje transkrypcję, białko PB1 jest transkryptazą elongacyjną, białko PA posiada funkcję transkryptazy o aktywności proteazy (14). Białko PB1-F2 prawdopodobnie odgrywa rolę w apoptozie i wirulencji (13). Mutacja w obrębie genu PB2 prowadząca do zastąpienia kwasu glutaminowego przez lizynę w pozycji 627 (E627K) sprawia, iż wirusy ptasie mogą się wydajnie replikować w komórkach ssaków. Potwierdziły to doświadczenia na myszach i fretkach (4, 5). Mutacja E627K została wykryta w wielu wirusach HPAI podtypu H5N1, szczególnie należących do kladu 2.2, które na przełomie 2005/2006 r. przedostały się z Chin do Europy (w tym Polski), Afryki oraz na Bliski Wschód i wywołały liczne zachorowania ptaków, ludzi i ssaków drapieżnych (16). Obecność identycznej mutacji wykazano ponadto w białku PB2 wirusa podtypu H7N7, który wyizolowano od zmarłego lekarza weterynarii w Holandii w 2003 r. krótko po jego wizycie w zakażonej fermie drobiu (2), a także w rekonstruowanej sekwencji PB2 wirusa grypy odpowiedzialnego za pandemię u ludzi w 1918 r., tzw. hiszpankę (20). Jednak nie wszystkie wirusy H5N1 izolowane od ludzi posiadały tę mutację, co potwierdza, że nie jest ona warunkiem koniecznym do efektywnego zakażenia człowieka (7, 15). Na przykładzie wirusa H7N7 wykazano ponadto, iż do wzrostu zjadliwości przyczynia się zastąpienie kwasu asparaginowego

przez asparaginę w pozycji 701 (D701N), seryny przez argininę w pozycji 714 (S714R) białka PB2, leucyny przez prolinę w pozycji 13 (L13P), a seryny przez asparaginę w pozycji 678 (S678N) białka PB1, a także lizyny przez asparaginę w pozycji 615 (K615N) białka PA (3).

Białka matriks

Gen M wirusa grypy koduje dwa białka matriksowe: M1, będące głównym składnikiem wirionu, biorącym udział w wydostawaniu się wirusa na zewnątrz komórki oraz białko M2, pełniące funkcję kanału jonowego (18). Jednym z celów terapii przeciwwirusowej w odniesieniu do grypy jest farmakologiczne zablokowanie kanału jonowego przy zastosowaniu leków z grupy adamantanów (np. amantadyny i rymantadyny). Adamantany stosowane są powszechnie w leczeniu grypy ludzkiej, jednak w niektórych krajach (np. USA) ze względu na powstawanie licznych mutantów opornych stosowanie tych chemioterapeutyków nie jest zalecane (1). Badanie izolatów wirusowych H5N1 należących do różnych genetycznie grup (kładow) przy użyciu metody pirosekwencjonowania wykazało obecność mutacji w genie M kodującym białko M2, prowadzących do wzrostu oporności na adamantany i polegających w szczególności na zastąpieniu izoleucyny przez leucynę w pozycji 26 (I26L), waliny przez alaninę w pozycji 27 (V27A) oraz seryny przez asparaginę w pozycji 31 (S31N).

Białka niestrukturalne (NS)

Białka niestrukturalne NS1 i NS2 kodowane są przez segment 8 wirusa, a ich rola polega głównie na wiązaniu RNA i hamowaniu procesu usuwania sekwencji niekodujących (splicing) (NS1) oraz ułatwieniu transportu nukleoproteiny z jądra komórkowego (NS2) (18). Wiele izolowanych w ostatnim okresie wirusów HPAI H5N1 posiada delecję 5 aminokwasów w pozycjach 80-84 białka NS1. Rola tej delecji nie została do tej pory w sposób jednoznaczny wyjaśniona, podejrzewa się jednak jej związek ze wzrostem patogenności (16).

Charakterystyka molekularna wirusów HPAI H5N1 izolowanych w Polsce w latach 2006-2007

Wysoco zjadliwa grypa ptaków wywołana przez podtyp H5N1 wystąpiła w Polsce dwukrotnie: w 2006 r. u ptaków dzikich, a w 2007 r. głównie u drobiu (12, 19). Przeprowadzona analiza molekularna wybranych krajowych izolatów wykazała obecność markerów molekularnych w hemaglutynie, wskazujących na wysoką patogenność (sekwencja aminokwasów w miejscu cięcia HA0 PQGERRRKKR/GLF, z dużą liczbą aminokwasów zasadowych – argininy i lizyny) oraz na powinowactwo do receptorów α -2,3 NeuAc, a więc występujących w przewodzie u ptaków. W neuraminidazie stwierdzono obecność delecji 20 aminokwasów (wzrost patogenności dla drobiu grzebiącego), jednak

nie wykazano markerów oporności na oseltamivir. Obecność mutacji E627K w białku PB2 wszystkich krajowych izolatów H5N1 jest markerem zwiększonej adaptacji i patogenności dla ssaków. W białku NS1 wykazano obecność delecji 5 aminokwasów w pozycjach 80-84 (17). Ogólnie należy stwierdzić, iż krajowe izolaty wirusów H5N1 charakteryzowały się wysoką patogennością dla ptaków, zwiększoną patogennością i adaptacją do organizmu ssaków, jednak pełną wrażliwością na najczęściej stosowane leki przeciw-wirusowe.

Podsumowanie

Wzajemne interakcje pomiędzy wirusem, gospodarzem a środowiskiem wynikają głównie ze zmienności genetycznej patogenu, która w przypadku wirusów RNA jest bardzo duża. Mutacje pojawiające się w wyniku błędów replikacji materiału genetycznego, jeśli nawet nie mają efektu letalnego, są zwykle bez znaczenia z punktu widzenia właściwości adaptacyjnych. Jednak każda zmiana, która nawet w niewielkim stopniu spowoduje lepsze przystosowanie się wirusa do aktualnie panujących warunków, poddawana jest selekcji naturalnej. Przedstawione w niniejszym artykule modyfikacje genetyczne mają bardzo często charakter zwykłych mutacji punktowych powodujących zmianę zaledwie jednego lub kilku aminokwasów. Jednak pojawiająca się w efekcie modyfikacja fenotypu może być bardzo istotna i prowadzić w konsekwencji do wzrostu patogenności, rozszerzenia spektrum żywicieli lub pojawienia się oporności na chemioterapeutyki. Wiele markerów molekularnych istotnych cech fenotypowych wirusów grypy zostało już zidentyfikowanych, jednak w dalszym ciągu odkrywane są kolejne. Ich ustalenie jest możliwe dzięki zastosowaniu sekwencjonowania kwasów nukleinowych. Coraz więcej laboratoriów badawczych posiada odpowiednie wyposażenie do prowadzenia tego typu badań. Ich wyniki są często upubliczniane, m.in. dzięki istnieniu platform internetowych, takich jak np. GISAID (Global Initiative on Sharing Avian Influenza Data), umożliwiających dostęp do informacji dotyczących wirusa grypy, w tym na bieżąco wprowadzanych sekwencji nukleotydowych z całego świata. W przeciwieństwie do najbardziej popularnej platformy GenBank®, dostęp do GISAID jest bardziej ograniczony ze względu na bardziej restrykcyjne uregulowania związane z zagadnieniami ochrony własności intelektualnej.

W zgodnej opinii ekspertów, śledzenie zmian w genomie wirusów grypy jest nie tylko potrzebą chwili (ze względu na zagrożenie ze strony wirusów H5N1 i A/H1N1), ale również koniecznością w perspektywie długofalowej, z uwagi na możliwość pojawienia się nowych wariantów genetycznych wirusa w przyszłości. Szybkie rozpoznanie ważnych markerów molekularnych w nowo pojawiających się szczepach wirusa grypy jest bardzo ważnym elementem systemu wczesnego ostrzegania.

Piśmiennictwo

- Cox N. J., Uyeki T. M.: Public health implications of avian influenza viruses, [w:] Swayne D. E. (ed.): Avian influenza. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2008, 453-484.
- Fouchier R. A., Schneeberger P. M., Rozendaal F. W., Broekman J. M., Kemink S. A., Munster V., Kuiken T., Rimmelzwaan G. F., Schutten M., Van Doornum G. J., Koch G., Bosman A., Koopmans M., Osterhaus A. D.: Avian influenza A virus (H7N7) associated with human conjunctivitis and a fatal case of acute respiratory distress syndrome. Proc. Natl Acad. Sci. USA 2004, 101, 1356-1361.
- Gabriel G., Herwig A., Klenk H. D.: Interaction of polymerase subunit PB2 and NP with importin alpha1 is a determinant of host range of influenza A virus. PLoS Pathog. 2008, 4, e11.
- Govorkova E. A., Rehg J. E., Krauss S., Yen H. L., Guan Y., Peiris M., Nguyen T. D., Hanh T. H., Puthavathana P., Long H. T., Buranathai C., Lim W., Webster R. G., Hoffmann E.: Lethality to ferrets of H5N1 influenza viruses isolated from humans and poultry in 2004. J. Virol. 2005, 79, 2191-2198.
- Hatta M., Gao P. P., Halfmann P., Kawaoka Y.: Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science 2001, 293, 1840-1842.
- Hulse D. J., Webster R. G., Russell R. J., Perez D. R.: Molecular determinants within the surface proteins involved in the pathogenicity of H5N1 influenza viruses in chickens. J. Virol. 2004, 78, 9954-9964.
- Jong M. D., Simmons C. P., Thanh T. T., Hien V. M., Smith G. J., Chau T. N., Hoang D. M., Chau N. V., Khanh T. H., Dong V. C., Qui P. T., Cam B. V., Ha Q. D., Guan Y., Peiris J. S., Chinh N. T., Hien T. T., Farrar J.: Fatal outcome of human influenza A (H5N1) is associated with high viral load and hypercytopenia. Nat. Med. 2006, 12, 1203-1207.
- Jong M. D., Thanh T. T., Khanh T. H., Hien V. M., Smith G. J., Chau N. V., Cam B. V., Qui P. T., Ha Q. D., Guan Y., Peiris J. S., Hien T. T., Farrar J.: Brief report – Oseltamivir resistance during treatment of influenza A (H5N1) infection. N. Engl. J. Med. 2005, 353, 2667-2672.
- Kawaoka Y., Webster R. G.: Evolution of the A/Chicken/Pennsylvania/83 (H5N2) influenza virus. Virology 1985, 146, 130-137.
- Matrosovich M., Stech J., Klenk H. D.: Influenza receptors, polymerase and host range. Rev. - Off. Int. Epizoot. 2009, 28, 203-217.
- Matsuoka Y., Swayne D. E., Thomas C., Rameix-Welti M. A., Naffakh N., Warnes C., Altholtz M., Donis R., Subbarao K.: Neuraminidase stalk length and additional glycosylation of the hemagglutinin influence the virulence of influenza H5N1 viruses for mice. J. Virol. 2009, 83, 4704-4708.
- Minta Z., Śmietanka K., Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Wijaszka T.: Wysoce zjadliwa grypa ptaków u dzikich ptaków w Polsce – analiza pierwszych przypadków. Medycyna Wet. 2007, 63, 1349-1352.
- Perdue M. L.: Molecular determinants of pathogenicity for avian influenza viruses, [w:] Swayne D. E. (ed.): Avian influenza. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2008, 23-41.
- Piekarowicz A.: Podstawy wirusologii molekularnej. Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2004, s. 612.
- Puthavathana P., Auewarakul P., Charoenying P. C., Sangsiriwut K., Pooruk P., Boonnak K., Khanyok R., Thawachsupha P., Kijphati R., Sawanpanyalerit P.: Molecular characterization of the complete genome of human influenza H5N1 virus isolates from Thailand. J. Gen. Virol. 2005, 86, 423-433.
- Sims L. D., Brown I. H.: Multicontinental epidemic of H5N1 HPAI virus (1996-2007), [w:] Swayne D. E. (ed.): Avian influenza. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2008, 251-286.
- Śmietanka K., Fusaro A., Domanska-Blicharz K., Salviato A., Monne I., Dundon W. G., Cattoli G., Minta Z.: Full-length genome sequencing of the polish HPAI H5N1 viruses suggests separate introductions in 2006 and 2007. Avian Dis. 2010, 54 (suppl), 335-339.
- Swayne D. E., Halvorson D. A.: Influenza, [w:] Diseases of Poultry. Blackwell Publishing, Ames, Iowa 2008, 153-184.
- Śmietanka K., Minta Z., Domańska-Blicharz K., Tomczyk G., Wijaszka T., Związek J., Batorczak Z., Bartoszewicz L.: Przypadki wysoce zjadliwej grypy ptaków H5N1 w Polsce w 2007 roku. Medycyna Wet. 2009, 65, 115-118.
- Taubenberger J. K., Reid A. H., Lourens R. M., Wang R., Jin G., Fanning T. G.: Characterization of the 1918 influenza virus polymerase genes. Nature 2005, 437, 889-893.
- Vines A., Wells K., Matrosovich M., Castrucci M. R., Ito T., Kawaoka Y.: The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. J. Virol. 1998, 72, 7626-7631.

Adres autora: dr Krzysztof Śmietanka, Al. Partyzantów 57, 24-100 Puławy, e-mail: ksmiet@piwet.pulawy.pl