

ZYGMUNT ZDROJEWICZ<sup>1</sup>, ANDRZEJ DUBIŃSKI<sup>2</sup>, KATARZYNA DUBIŃSKA<sup>2</sup>

## Rola receptorów estrogenowych i ich polimorfizmu w występowaniu zaburzeń funkcji śródbłónka i rozwoju miażdżycy

### The Role of Estrogen Receptors and Their Polymorphism in Endothelial Dysfunction and Atherosclerosis

Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami AM we Wrocławiu  
Powiatowe Centrum Zdrowia, Oddział Wewnętrzny Szpitala Powiatowego w Kamiennej Górze

#### Streszczenie

W pracy przedstawiono aktualne poglądy dotyczące znaczenia receptorów estrogenowych i ich polimorfizmu na występowanie zaburzeń funkcji śródbłónka oraz rozwój i progresję miażdżycy. Zwrócono również uwagę na zwiększenie się częstości chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet w okresie pomenopauzalnym (*Adv Clin Exp Med.* 2005, 14, 6, 1289–1293).

**Słowa kluczowe:** receptory estrogenowe, polimorfizm, miażdżycy.

#### Abstract

In this work the authors presented current opinions of estrogen receptors and their polymorphism in their relationship between endothelial dysfunction and atherosclerosis. The authors also pay attention to risk in development of coronary heart disease in postmenopausal women (*Adv Clin Exp Med.* 2005, 14, 6, 1289–1293).

**Key words:** estrogen receptors, polymorphism, atherosclerosis.

## Znaczenie hormonalnej terapii zastępczej w prewencji choroby niedokrwiennej serca i jej wpływ na czynniki ryzyka miażdżycy

Schorzenia układu sercowo-naczyniowego są główną przyczyną chorobowości i śmiertelności kobiet w okresie pomenopauzalnym [1]. Przed menopauzą choroby te występują niezmiernie rzadko, co jest związane z ochronnym działaniem hormonów płciowych, przede wszystkim estrogenów. Można zatem przypuszczać, że hormonalna terapia zastępcza (HTZ) stanie się „złotym standardem” w leczeniu tych schorzeń. Tym niemniej zakończone ostatnio duże próby kliniczne, między innymi

HERS (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study*), HERS II (*Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study follow-up*) oraz WHI (*US Women's Health Initiative*), w których oceniano HTZ w prewencji pierwotnej i wtórnej choroby niedokrwiennej serca nie przyniosły zakładanych korzyści. Badania te zostały przerwane przedwcześnie z uwagi na wzrost ryzyka wystąpienia udarów mózgu, zawałów serca, zakrzepowej choroby żyłnej czy raków sutka [2–6]. Należy jednak zaznaczyć, że w wielu pracach doświadczalnych i badaniach klinicznych wykazano, że stosowanie estrogenów obniża stężenie czynników ryzyka miażdżycy, w tym: lipidów o małej gęstości (LDL), cholesterolu całkowitego, apolipoproteiny AII, apolipoproteiny B, markerów stanu zapalnego oraz czynników krzepnięcia, zwiększając jednocześnie potencjał fibrynolityczny [7–10]. Stwierdzono ponadto dilatacyjny wpływ estrogenów na

ścianę naczyń, który zależy od bezpośredniego działania na receptory estrogenowe [11]. Uzyskanie tak różnych wyników badań wskazuje, że mimo suplementacji brakujących hormonów i wystąpienia związanych z tym korzystnych reakcji, może wystąpić aktywacja mechanizmów odpowiedzialnych za progresję miażdżycy i zwiększenie częstości schorzeń układu sercowo-naczyniowego.

Celem pracy było przedstawienie, na podstawie aktualnego piśmiennictwa, znaczenia receptorów estrogenowych i ich polimorfizmu na występowanie i progresję miażdżycy oraz wynikającego stąd wzrostu częstości chorób układu sercowo-naczyniowego u kobiet.

## **Charakterystyka receptorów estrogenowych i ich znaczenie w zapobieganiu miażdżycy i zaburzeń funkcji śródbłónka**

Receptory estrogenowe (ER) występują głównie w komórkach śródbłónka naczyniowego, komórkach mięśni gładkich, a także w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej, zwłaszcza w limfocytach T CD4<sup>+</sup> oraz limfocytach B [12, 13]. Wydaje się, iż odgrywają ważną rolę w zapobieganiu miażdżycy tętnic u kobiet i to zarówno w okresie przed-, około-, jak i pomenopauzalnym. Receptory ER należą do receptorów jądrowych. Aktywacja ich prowadzi nie tylko do połączenia receptora ze swoistą sekwencją DNA promotora genów, ale także może przejawiać się bezpośrednim pobudzeniem wewnątrzkomórkowych szlaków białkowych przede wszystkim szlaku kinaz [14]. Receptory estrogenowe hamują migrację i proliferację komórek mięśni gładkich błony naczyniowej między innymi przez regulację wytwarzania tlenu azotu (NO). Przyczyniają się ponadto do odtworzenia funkcji śródbłónka naczyniowego, wpływając korzystnie na gojenie się uszkodzeń ściany naczyniowej, np. występujących w następstwie zabiegów angioplastyki przezskórnej naczyń wieńcowych serca [15]. W eksperymencie przeprowadzonym na myszach wykazano, że w pozbawionej ER  $\alpha$  i  $\beta$  aortie niezmiennionej chorobowo dochodzi do trzykrotnego zmniejszenia ekspresji indukowanej syntazy tlenu azotu (iNOS), stężenie śródbłonkowej syntazy tlenu azotu (eNOS) oraz wrażliwość aorty na działanie noradrenaliny pozostają natomiast niezmiennione [16]. Takie działanie wskazuje na rolę ER również w nieswoistych mechanizmach obronnych organizmu.

Receptory estrogenowe zapobiegają zaburze-

niom funkcji śródbłónka, wystąpieniu i progresji miażdżycy przez wzrost stężenia eNOS i zależny od śródbłónka rozkurcz naczyń. Za działanie to, jak wykazali Muller-Delp et al., częściowo jest odpowiedzialna aktywacja ER  $\alpha$ . W przeprowadzonym badaniu, do którego użyto tętnic wieńcowych myszy, wykazali, że pobudzenie przez estrogeny ER  $\alpha$  reguluje stężenie eNOS, wpływając w ten sposób na zależną od NO dilatację naczyń [15]. W badaniu Widder et al. oceniono wpływ selektywnego agonisty ER  $\alpha$  oraz 17-beta estradiolu (E2) na prowokowaną acetylocholiną oraz nitroprusydkiem sodu dilatację aorty szczurów poddanych owarektomii. Pobudzenie ER  $\alpha$  zwiększało indukowaną przez acetylocholinę relaksację śródbłónka zależną od NO, nie miało natomiast wpływu na niezależne od śródbłónka działanie nitroprusydku sodu [17].

## **Znaczenie gęstości receptorów estrogenowych w rozwoju miażdżycy**

Podobne znaczenie miały badania dotyczące rozmieszczenia i gęstości ER oraz ich wpływu na proliferację oraz migrację z błony środkowej do błony wewnętrznej tętnicy komórek mięśni gładkich. W pracy Nakamura et al. wykazano zwiększoną ekspresję genu *E4F1*, gdy w hodowlach ludzkich komórek mięśni gładkich aorty były obecne receptory ER  $\alpha$  wrażliwe na działanie estrogenów. Zwiększoną liczbę ER  $\alpha$  stwierdzono w aorcie z początkowymi, a nie z zaawansowanymi zmianami miażdżycowymi u kobiet w okresie przedmenopauzą. Zablockowanie genu *E4F1* prowadziło do proliferacji mięśni gładkich ściany naczyń. Badania te wskazały na istotną rolę genu *E4F1* w zapobieganiu miażdżycy przez zależną od estrogenów aktywację tych receptorów [18]. Również i w innym badaniu wykazano, iż pobudzenie ER  $\alpha$  przez estradiol hamuje proliferację i migrację komórek błony naczyniowej, a aktywacja ER  $\beta$  nie ma na to wpływu [19]. W obu przedstawionych wyżej pracach stwierdzono, że liczba receptorów estrogenowych była największa, gdy nasilenie zmian miażdżycowych było niewielkie. Takie same zależności między stopniem nasilenia procesu miażdżycowego a liczbą ER wykazano w badaniach przeprowadzonych przez Losordo et al. [20]. W innym badaniu natomiast, w którym wykorzystano badania autopsyjne 52 kobiet w wieku przedmenopauzalnym wykazano większe zmiany miażdżycowe w gałęzi przedniej zstępującej tętnicy wieńcowej lewej, a także zwiększoną ekspresję ER w blaszkach miażdżycowych, w strefach bogatych w makrofagi oraz lipidy w grupie osób z centralną otyłością. Zwiększona

liczba ER mogłaby w tym przypadku kompensować większe ryzyko progresji miażdżycy, jakie występuje przy tak niekorzystnym profilu otyłości [21].

## Wpływ estrogenów na przekąźniki wewnątrzkomórkowe

Estrogeny w odpowiedzi na uszkodzenie ściany naczynia pobudzają wiele przekąźników wewnątrzkomórkowych, wśród których podstawowe znaczenie ma MAPK (*mitogen-activated protein kinase*). W wyniku takiego działania zmienia się aktywność chemotaktyczna, mitogenna i migracyjna komórek. W przeprowadzonych przez Geraldese et al. badaniach wykazano, że pobudzenie ER  $\beta$  komórek mięśni gładkich przez 17- $\beta$ -estradiol zmniejsza fosforylację białek p42/44 i p38 MAPK indukowaną przez płytkowy czynnik wzrostu (PDGF) i w jej następstwie prowadzi do zahamowania proliferacji i migracji tych komórek. Aktywacja ER  $\alpha$  nasila, przez szlak kinaz, proliferację komórek śródbłonka, przyczyniając się do odbudowania jego funkcji, nie wpływa natomiast na proliferację i migrację mięśni gładkich [22].

Zarówno niedobór estrogenów, jak i zaburzenia gospodarki lipidowej oraz nadciśnienie tętnicze powodują zaburzenia funkcji śródbłonka aorty i naczyń wieńcowych serca. Poprawa czynności śródbłonka prowadzi między innymi do zahamowania ekspresji molekuł adhezyjnych, np. cząsteczki adhezji komórkowej 1 (VCAM-1 – *vascular cell adhesion molecule-1*) oraz cząsteczki adhezji międzykomórkowej 1 (ICAM-1 – *intercellular adhesion molecule-1*), zmniejszenia aktywności cytokin zapalnych, w tym czynnika martwicy nowotworu  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) oraz interferonu.

W badaniu Mori et al. stwierdzono hamujący wpływ estradiolu (E2) na zależną od TNF- $\alpha$  aktywację czynnika jądrowego  $\kappa$  B, ekspresję cząsteczki VCAM-1 oraz adhezję monocytów do komórek śródbłonka naczyniowego. Efekt ten wprost proporcjonalnie zależał od liczby ER  $\alpha$  [23].

## Znaczenie polimorfizmu genów dla receptorów estrogenowych w rozwoju miażdżycy

Interesujące wydają się badania dotyczące polimorfizmu genów dla ER. W badaniu Rotterdam Study, do którego zakwalifikowano 2617 męż-

czyzn oraz 3791 kobiet w wieku co najmniej 55 lat analizowano zależności między wystąpieniem zawału serca, zabiegami rewaskularyzacji mięśnia sercowego i śmiercią z powodu choroby niedokrwiennej serca w czasie 7-letniej obserwacji a polimorfizmem dla genów ER. Wykazano, iż wystąpienie polimorfizmu *Pvull* (c.454–397 T>C) oraz *Xbal* (c.454–351 A>G) wiąże się u kobiet z istotnym statystycznie wzrostem ryzyka wystąpienia zawału serca oraz inwazyjnych procedur w zakresie naczyń wieńcowych, niezależnie od obecności czynników ryzyka miażdżycy. W odniesieniu natomiast do populacji mężczyzn nie wykazano takich różnic [24]. W innym badaniu, do którego zakwalifikowano 858 chorych (w tym 148 kobiet) poddanych angioplastyce przezskórnej tętnic wieńcowych z implantacją stentu oceniano występowanie restenozy po sześciu miesiącach od zabiegu. Badania te wykazały w grupie kobiet silną dodatnią korelację między występowaniem restenozy w stencie a obecnością polimorfizmu T/T *Pvull*. Również i w tym badaniu uzyskane wyniki były niezależne od współlistnienia czynników ryzyka choroby niedokrwiennej serca. Jednym z możliwych powodów wykazanych różnic była wynikająca z polimorfizmu genu dla ER mniejsza ekspresja receptorów, co przy małym stężeniu estrogenów u kobiet w okresie pomenopauzalnym, prowadziło do szybszego i zapewne bardziej zaawansowanego rozwoju zmian miażdżycowych [25]. W innym badaniu przeprowadzonym przez Almeida et al. oceniono występowanie zależności między stężeniami LDL oraz całkowitego cholesterolu w surowicy a polimorfizmem dwóch genów dla ER (1082 G>A oraz 1730 A>G) u kobiet o różnym profilu aktywności hormonalnej. W pracy tej stwierdzono istotnie mniejsze stężenia LDL oraz całkowitego cholesterolu w grupie z genotypem G/A w porównaniu do grupy z genotypem G/G. Różnice te dotyczyły kobiet w okresie przedmenopauzalnym oraz kobiet po menopauzie przyjmujących HTZ. W odniesieniu do osób po menopauzie niestosujących HTZ nie wykazano takich zależności. Badania te wskazały na istotne znaczenie polimorfizmu genów dla ER w wystąpieniu zaburzeń lipidowych u kobiet z prawidłowym profilem aktywności hormonalnej dla estrogenów [26]. W badaniu Lu et al., w którym badano 197 mężczyzn oraz 98 kobiet w okresie pomenopauzalnym z rodzinną heterozygotyczną hipercholesterolemią wykazano znamienne częstsze występowanie choroby niedokrwiennej serca u osób z genotypem G/G dla polimorfizmu *Xbal* [27]. Wpływ polimorfizmu genów dla ER (*Pvull* oraz *Xball*) na stężenie hormonów płciowych oraz związane z menopauzą objawy przedstawiono w pracy Malacara et al., w której wykazano, iż je-

dynie uczucie gorąca oraz suchości pochwy stwierdza się znamienne częściej u kobiet z polimorfizmem genów dla ER. W odniesieniu do stężenia lutropiny, folitropiny, estronu i estradiolu oraz następujących stanów emocjonalnych: depresji, lęku, zaburzeń snu, nie występują natomiast takie zależności [28]. Wydaje się zatem, że polimorfizm genów dla ER ma znaczenie w występowaniu i progresji zmian miażdżycowych niezależnie od stanu emocjonalnego oraz stężenia hormonów płciowych u kobiet w okresie pomenopauzalnym.

## Podsumowanie

Rola receptorów estrogenowych i ich polimorfizmu w występowaniu chorób układu sercowo-naczyniowego nie jest do końca poznana. Być może dlatego ostatnio zakończone randomizowane próby kliniczne, kontrolowane placebo nie przyniosły oczekiwanej odpowiedzi na pytanie o celowość stosowania HTZ. Być może bardziej szczegółowa analiza otrzymanych wyników z za-

kończonych ostatnio badań klinicznych oraz szersze wykorzystanie badań genetycznych pozwolą na uzyskanie większych korzyści z HTZ [29]. Nie bez znaczenia może być również stosowanie wprowadzonych ostatnio nowych leków, w tym selektywnych modulatorów receptorów estrogenowych, związków syntetycznych o łącznym działaniu estrogenu i progesteronu oraz środków o dodatkowych właściwościach (antyaldosteronowych).

W wielu badaniach wykazano korzystny wpływ estrogenów na odbudowę funkcji śródbłonna oraz zahamowanie wystąpienia i progresji miażdżycy. Działania te, na które wpływ ma między innymi polimorfizm genów dla ER, zależą między innymi od ekspresji receptorów estrogenowych zwłaszcza u kobiet w okresie pomenopauzalnym, u których stężenie estrogenów jest małe. Działania takie są realizowane między innymi przez zahamowanie migracji i proliferacji komórek mięśni gładkich ściany naczyniowej, wpływ na przekaźniki wewnątrzkomórkowe oraz regulację wytwarzania NO.

## Piśmiennictwo

- [1] Bello N, Mosca B: Epidemiology of coronary heart disease in women. *Prog Cardiovasc Dis* 2004, 46, 287–295.
- [2] Brass LM: Hormone replacement therapy and stroke: clinical trials review. *Stroke*. 2004, 35, Suppl. 1, 2644–2647.
- [3] Vittinghoff E, Shlipak MG, Varosy PD, Furberg CD, Ireland CC, Khan SS, Blumenthal R, Barrett-Connor E, Hulley S, Heart and Estrogen/progestin Replacement Study Research Group. Risk factors and secondary prevention in women with heart disease: the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study. *Ann Intern Med* 2003, 138, 81–89.
- [4] Hulley S, Furberg C, Barret-Conno, Cauley J, Grady D, Haskell W, Knopp R, Lowery M, Satterfield S, Schrott H, Vittinghoff E, Hunninghake D, HERS Research Group: Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II). *JAMA* 2002, 288, 58–66.
- [5] Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M, Women's Health Initiative Investigator: Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* 2003, 349, 523–534.
- [6] Women's Health Initiative Steering Committee: Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized trial. *JAMA* 2004, 291, 1701–1712.
- [7] Borgfelt C, Li C, Samsioe G: Low-dose oral combination of 17 beta-estradiol and norethisterone acetate in postmenopausal women decreases factor VII, fibrinogen, antithrombin and plasminogen activator inhibitor-1. *Climacteric* 2004, 7, 78–85.
- [8] Zhang Y, Howard BV, Cowan LD, Welty TK, Schaefer CF, Wild RA, Yeh J, Lee ET: Associations of postmenopausal hormone therapy with markers of hemostasis and inflammation and lipid profiles in diabetic and nondiabetic American Indian women: the Strong Heart Study. *J Womens Health (Larchmt)* 2004, 13, 155–163.
- [9] Miller AP, Feng W, Xing D, Wethington NM, Blalock JE, Chen YF, Oparil S: Estrogen modulates inflammatory mediator expression and neutrophil chemotaxis in injured arteries. *Circulation* 2004, 110, 1664–1669.
- [10] Seed M, Knopp RH: Estrogens, lipoproteins, and cardiovascular risk factors: an update following the randomized placebo-controlled trials of hormone-replacement therapy. *Curr Opin Lipidol* 2004, 15, 459–467.
- [11] Zhu W, Everson WV, Smart EJ: Estrogen in cardiovascular disease. *Curr Opin Lipidol* 2004, 15, 589–593.
- [12] Karas RH, Patterson B, Mendelsohn ME: Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 1994, 89, 1943–1950.
- [13] Phiel KL, Henderson RA, Adelman SJ, Elloso MM: Differential estrogen receptor gene expression in human peripheral blood mononuclear cell populations. *Immunol Lett* 2004, 97, 107–113.
- [14] Barchiesi F, Jackson EK, Imthurn J, Fingerle J, Gillespie DG, Dubey RK: Differential regulation of estrogen receptor subtypes alpha and beta in human aortic smooth muscle cells by oligonucleotides and estradiol. *J Clin Endocrinol Metab* 2004, 89, 2373–2381.

- [15] Muller-Delp JM, Lubahn DB, Nichol KE, Philips BJ, Price EM, Curran EM, Laughlin MH: Regulation of nitric oxide-dependent vasodilation in coronary arteries of estrogen receptor- $\alpha$ -deficient mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2003, 285, 2150–2157.
- [16] Liang M, Ekblad E, Lydrup ML, Nilsson BO: Combined lack of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  affects vascular iNOS protein expression. *Cell Tissue Res* 2003, 313, 63–70.
- [17] Widder J, Pelzer T, von Poser-Klein C, Hu K, Jazbutyte V, Fritzemeier KH, Hegele-Hartung C, Neyses L, Bauersachs J: Improvement of endothelial dysfunction by selective estrogen receptor- $\alpha$  stimulation in ovariectomized SHR. *Hypertension* 2003, 42, 991–996.
- [18] Nakamura Y, Igarashi K, Suzuki T, Kanno J, Inoue T, Tazawa C, Saruta M, Ando T, Moriyama N, Furukawa T, Ono M, Moriya T, Ito K, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H: EAF1, a novel estrogen-responsive gene in possible atheroprotection, revealed by microarray analysis. *Am J Pathol* 2004, 165, 2019–2031.
- [19] Nakamura Y, Suzuki T, Miki Y, Tazawa C, Senzaki K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H: Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. *Mol Cell Endocrinol* 2004, 219, 17–26.
- [20] Losordo DW, Kearney M, Kim EA: Variable expression of the estrogen receptor in normal and atherosclerotic coronary arteries of postmenopausal women. *Circulation* 1994, 89, 1501–1510.
- [21] Kortelainen ML, Huttunen P: Expression of estrogen receptors in the coronary arteries of young and postmenopausal women in relation to central obesity. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2004, 28, 623–627.
- [22] Geraldès P, Sirois MG, Tanguay JF: Specific contribution of estrogen receptors on mitogen-activated protein kinase pathways and vascular cell activation. *Circ Res* 2003, 93, 399–405.
- [23] Mori M, Tsukahara F, Yoshioka T, Irie K, Ohta H: Suppression by 17  $\beta$ -estradiol of monocyte adhesion to vascular endothelial cells is mediated by estrogen receptors. *Life Sci* 2004, 75, 599–609.
- [24] Schuit SC, Oei HH, Wittman JC, Geurts van Kessel CH, van Meurs JB, Nijhuis RL, van Leeuwen JP, de Jong FH, Zillikens MC, Hofman A, Pols HA, Uitterlinden AG: Estrogen receptor  $\alpha$  gene polymorphisms and risk of myocardial infarction. *JAMA* 2004, 291, 2969–2977.
- [25] Ferrero V, Ribichini F, Matullo G, Guarrera S, Carturan S, Vado A, Vassanelli C, Piazza A, Uslenghi E, Wijns W: Estrogen receptor-polymorphisms and angiographic outcome after coronary artery stenting. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003, 23, 2223–2234.
- [26] Almeida S, Franken N, Zandona MR, Osorio-Wender MC, Hutz MH: Estrogen receptor 2 and progesterone receptor gene polymorphisms and lipid levels in women with different hormonal status. *Pharmacogenomics J* 2004, 5, 30–34.
- [27] Lu H, Higashikata T, Inazu A, Nohara A, Yu W, Shimizu M, Mabuchi H: Association of estrogen receptor- $\alpha$  gene polymorphisms with coronary artery disease in patients with familial hypercholesterolemia. 2002, 22, 817–823.
- [28] Malacara JM, Perez-Luque EL, Martinez-Garza S, Sanchez-Marin FJ: The relationship of estrogen receptor- $\alpha$  polymorphism with symptoms and other characteristics in post-menopausal women. *Maturitas* 2004, 49, 163–169.
- [29] Pertyński T, Stachowiak G: Bezpieczna hormonalna terapia zastępcza. Scheringówka. 2004, 2, 21–23,

### Adres do korespondencji:

Zygmunt Zdrojewicz  
Katedra i Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Leczenia Izotopami AM  
Wybrzeże L. Pasteura 4  
50–367 Wrocław

Praca wpłynęła do Redakcji: 03.02.2005 r.

Po recenzji: 25.02.2005 r.

Zaakceptowano do druku: 7.03.2005 r.

Received: 03.02.2005

Revised: 25.02.2005

Accepted: 7.03.2005