

# T ve B Hücre Ontogenisi ve Sınıflamaya Adaptasyonu

Nükhet TÜZÜNER

İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Patoloji Anabilim Dalı

Lenfoid tümörlerin tümünde neoplastik hücrelerin normal karşılıkları tam olarak bilinmesede özellikle B hücreli neoplazilerin çoğu için bu bilgi mevcuttur. Lenfoma sınıflamasında normal B ve T hücrelerinin gelişim aşamalarının bilinmesi belli lenfoma tiplerinin morfolojik ve immunfenotipik hatta klinik özelliklerini anlayabilmek için çok gerekli bir çerçeve sağlar.

## Normal Lenfoid Dokular

Lenfoid dokular öncü lenfoid hücrelerin bulunduğu, antijene yanıt verebilecek naif hücrelerin geliştiği santral lenfoid dokular ve naif hücrelerin antijene yanıt vererek çoğaldıkları periferik lenfoid dokular olarak 2 ana grupta toplanır. Periferik lenfoid dokular ise dalak, lenf düğümleri ve mukozal lenfoid dokular olarak ayrılırlar.

## Santral Lenfoid Dokular

### *Kemik iliği*

Kemik iliği insanlarda ve diğer memelilerde lenfositler ve kan hücrelerinin üretim alanıdır. B lenfositlerinin antijene yanıt verecek olgunluğa kemik iliğinde geldikleri bilinmektedir. İmmunolojideki ilk deneysel çalışmalar antikör oluşturan B hücrelerin kuş türü hayvanlarda kloaka yakınında yer alan bir lenfoid organda (Fabricius Bursası) geliştiklerini göstermiş olduğundan bu hücrelere B-lenfositleri denilmiştir. T lenfosit öncüleri de kemik iliği kökenlidir ancak olgunlaşmaları timusta olduğu için T lenfositleri olarak adlandırılırlar.

### *Timus*

Ön mediastende bulunan timus epitelial ve

dendritik hücrelerden oluşur. Bunlar arasında kemik iliğinden göç eden blastik öncü T hücreleri doldurur. Epitelial ve dendritik hücreler immatür T hücrelerinin antijene yanıt verecek olgunluğa erişmeleri ve seleksiyonları için uygun bir çevre oluşturur.

## Periferik Lenfoid Dokular

### *Lenf düğümleri*

Lenfatikler boyunca vücudun her alanına dağılan lenf düğümleri antijeni süzen başlıca filtre organlarıdır. Antijen spesifik B hücrelerinin çoğalmasında plazma hücreleri, efektör ve bellek hücreleri oluşumu belli organ ve dokuları direne eden lenf düğümlerinde gelişir. Lenf düğümleri korteks, medulla, kortikal ve medüller sinüslerden oluşur. Sinüsler antijeni alıp işlemde geliren makrofajları barındırır, antijen sunan diğer hücrelerden, bağlantılı retiküler hücreler (*interdigitating reticular cells*) medulla ve parakortekste yer alırlar. Parakorteks de ayrıca T ve B lenfositlerinin lenf düğümüne girdikleri post kapiller venüller ve antijen sunan *epidermal langerhans hücreleri* de bulunur. Korteks, naif B hücrelerinin yer aldığı primer foliküller ve antijene yanıt olarak çoğalan B hücrelerinin yer aldığı germinal merkezli folikülleri içerir. İmmun yanıt sonrası oluşan efektör B hücreleri ve plazma hücreleri medulla kordonlarında toplanarak medüller sinüslerle lenf düğümünü terk eder.

### *Dalak*

Kanda bulunan antijenlere yanıt dalakta gelişir. Dalagın partiküllü antijenleri süzen bölümü *kırmızı pulpa* olup işlemde geçen antijenin tanın-

ması ve buna karşı gelişen yanıt, T hücreleri için peri arterioler lenfosit kılıfları (PALS), B lenfositleri için Malpiki cisimciklerinde yer alan folikül ve germinal merkezlerde gerçekleşir. Bu alanların tümü *beyaz pulpa* olarak bilinir. Özellikleri lenf düğümündeki gibidir.

#### Mukoza ilişkili Lenfoid Dokular (MALT)

Lümendeki antijene yoğun olarak maruz kalan Waldeyer halkası, gastrointestinal sistem ve akciğerlerde (bronş) yüzey epiteli altında yer alan özgün lenfoid dokulardır. Bu dokularda B hücreleri ve antijen spesifik plazma hücreleri öncelikli olarak bulunmakla birlikte immün yanıtın gelişebilmesi için gerekli olan ve lenf düğümlerindeki parakortekse eşdeğer bir T bölgesi de bulunur.

#### Lenfosit Farklılaşması

T ve B hücrelerinin gelişiminde *antijenden bağımsız* ve *antijene bağımlı* olmak üzere iki dönem bulunur. Antijenden bağımsız olan dönem santral lenfoid organlarda tamamlanır. Bu organlarda antijeni selektif olarak tanıyabilme çeşitliliğinde T ve B hücreleri yapılır ve seçilir. Proliferasyon ve diferansiyasyon hızlıdır. Antijen bağımlı olan dönem ise spesifik antijen ile seçilen T ve B lenfositlerinin klonal çoğalmaları, efektör ve bellek hücrelere dönüşümlerini kapsar. Bu dönemde de çoğalma ve farklılaşma hızlıdır. Kolayca anlaşılacağı gibi antijen bağımsız ve bağımlı dönemlerin proliferatif evrelerindeki hücrelere karşılık gelen lenfoid tümörler *agresif* oysa naif veya efektör hücrelere karşılık olanlar yavaş seyirli (*indolent*) tümörler olacaktır.

#### B hücre farklılaşması

##### Antijen bağımsız evre

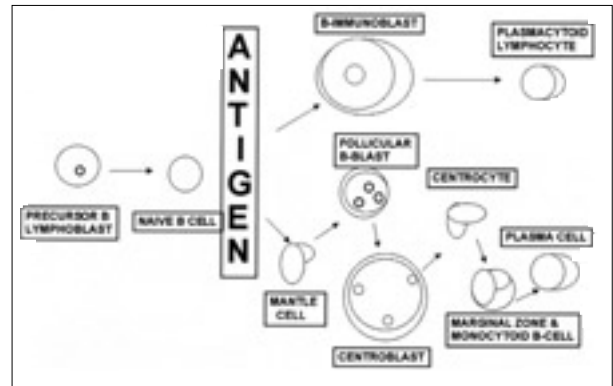
Öncü B (*stem*) hücreleri Ig ağır zincir genlerinde yeniden düzenlenmelerin başladığı TdT, CD34, CD10, sitoplazmik CD79a ve HLA-DR ekspresyen eden ancak yüzey Ig içermeyen hücrelerdir. Bu immatür B hücreleri pan-B antijenleri içinde en erken sitoplazmada CD22 ve yüzeylerinde CD19 içerirler. [CD45 (LCA) CD20 antijeninden sonra belirir. Bu nedenle erken B hücrelerinin ve karşılık gelen neoplazilerinin tanınmasında rol aynamaz]. Daha sonra sitoplazmik  $\mu$  zinciri yapılır: Bu B hücreleri sırasıyla, *pro B* ve *pre B* hücreleridir. Bu dönemi hafif zincir genlerinden önce  $\mu$  sonra  $\lambda$  zincir genlerinde yeniden düzenlenmeler izler ve sIgM+ immatür B hücreleri gelişir. Bu hücreler TdT, CD34 ve CD10 içermezler. Öncü B hücrelerinin neoplastik

karşılıkları *pro B*, *pre B* ve *Common B lenfoblastik lösemi* lerdir. Nadirde olsa solid tümörler olarakta görülebilirler (*B hücreli lenfoblastik lenfoma*)

Naif B hücreleri, antijene yanıt verecek olgunluğa erişmiş kemik iliğini terk etmeye hazır yüzeylerinde IgM ve IgD yi birlikte içeren Ig ağır zincir genleri düzenlenmiş ancak mutasyon göstermeyen hücrelerdir. Bu hücrelerde  $\mu$  ve  $\lambda$  hafif zincirlerinden sadece biri bulunur ve antijenle aktivasyondan sonra o lenfositten gelişecek tüm hücrelerde aynı hafif zincir kalır (*hafif zincir izotipi değişmez*). Naif B hücreleri pan B yüzey antijenleri (CD19, CD20, CD22, CD 40, CD79a), kompleman reseptörleri (CD21 ve CD35), adezyon molekülleri (CD44, CD23, L-selektin), pan T antijeni olan CD5 ve HLA DR antijenlerini yüzeylerinde taşırlar. Bu yüzey antijenleri, antijen sunan hücrelerle etkileşimde, endotele yapışmada, T hücreleriyle etkileşimdeki sinyal iletimlerinde rol alır. Antijenle karşılaşmamış istirahatteki B hücreleri yaşamlarını sürdürebilmek için bcl-2 proteini oluştururlar.

Naif B hücreleri, fetal yaşamda dalaktaki başlıca lenfoid hücreleri oluştururlar. Erişkin yaşamda kanda dolandıkları gibi (*recirculating B cells*), primer lenfoid foliküllerde ve foliküllerin mantle bölgelerinde bulunurlar. Reaktif foliküllerin mantle bölgelerinden elde edilen tek hücre çalışmaları bu hücrelerin IgH genlerinin mutasyona uğramadıklarını göstermiştir (*pre-GM hücreleri*).

CD5+ naif B hücrelerinden kaynaklanan tümörler bu hücrelerin dolanan karakterlerini yansıtmayacak şekilde ileri evrede ve yaygın olup lösemik formda olurlar. CD5+ naif B hücrelerinden kaynaklanan iki lenfoid tümör *B hücreli kronik lenfositik lösemi* ve *mantle hücreli lenfomadır*.



Şema 1: B hücre farklılaşma aşamaları (4 no'lu kaynaktan alınmıştır)

**Antijen bağımlı B hücre farklılaşması.**

B hücreleri gelişiminde antijenle karşılaşmamış B hücrelerinin yerleri ve immunfenotipleri ile antijenle karşılaşmadan sonra gelişen değişiklikler immunhistokimya, tek hücre izolasyonu ve flow sitometrik analizler sonucu gayet iyi bilinmektedir.

**IgD+ CD38- B hücreleri (Naif B hücreleri):**

Foliküllerin *mantle bölgesinde* bulunurlar. IgM+, CD5+, CD44+ ve bcl-2+ olup IgVH genlerinde henüz somatik mutasyonlar yoktur. Bu naif mantle hücreleri CD23 ekspresyonlarına göre 2 guruba ayrılır

*CD23- (Bm1)*: Muhtemelen son gelişen naif B hücreleridir, *CD23+ (Bm2)* : CD23 ligandı kazanan seçilmiş gurubu yansıtır.

IgD+ B hücrelerinin CD38 ekspresyonu ile gerçek germinal merkez hücre özellikleri başlar.

**IgD+ CD38+ B hücreleri:** CD 10, CD71 ve FAS (+) ancak bcl-2 (-) dir. Ki-67 ile proliferatif olduklarını gösterilir. Bu CD38+ IgD+ hücrelerinde 2 alt gurubu vardır

*IgM+ alt tip: (Bm2')GM (founder) fon hücreleri* de denir zira IgVH genlerinde somatik mutasyonlar yoktur yada çok azdır.

*IgM- alt tip:* IgVH genlerinde çok sayıda somatik mutasyon vardır. Bu germinal merkez hücrelerinin fonksiyonel önemi bilinmemektedir. Çoğunun delesyona uğradıkları düşünülmektedir.

GM lerde bulunan az sayıdaki CD38+ IgD + olan ve az sayıda IgVH mutasyonu taşıyan B hücreleri plazma ve memory hücrelerine dönüşürler

**IgD- CD38+ B hücreleri:** Geleneksel GM hücreleridir. CD10, CD70, FAS (+) bcl-2 (-) olup yüksek proliferatif kapasitededirler. Antijen veya CD40L ile uygun sinyal almadıklarında apoptoza giderler. Yüksek düzeylerde p53, MYC, BAX ve FAS proteinleri taşırlar.

GM lerde morfolojik olarak bile 2 farklı hücre ayırılır. Herikisindedir IgVH genlerinde süregiden somatik mutasyonlar vardır. Bunlar *CD77 + Sentroblast (Bm3)*, ve *CD77- Sentrosit (Bm4)* lerdir.

GM de CD38 ve IgD negatif olan ancak GM antijenleri ve marginal zon antijenleri taşımayan bir B hücre popülasyonunda vardır. Bunların istirahatteki memory B hücreleri oldukları düşünülür.

**Marginal zon B lenfositleri:** Tüm sekonder lenfoid organlarda bulunurlar, ancak antijen girişinin daha bol olduğu dalak, payer plakları ve mezenter lenf düğümleri gibi lenfoid dokularda daha net olarak gözükürler. İmmun fenotipleri *CD5-, CD10-, CD23-, IgM+ dir.*

Marginal zon dalakta perimarginal kavernoöz si-

nüse, Waldeyer halkasında kript epiteline, payer plaklarında dome epiteline yakın perifoliküler alanda yer alır ki bu antijen girişine yakın alanları temsil eder. Periferik lenf düğümlerinde ise daha zor seçilmekle birlikte benzer ilişkide supkortikal veya kortikal, parakortikal sinüslere yakın olarak seçilirler.

Marginal zon B lenfositleri heterojen bir popülasyon oluşturur. Bunlar başlıca naif ve memory B hücrelerinden oluşurlar. Araştırmalar marginal zon B lenfositlerinin 3 patern gösterdiğini vurgulamaktadır. Somatik hipermutasyon göstermeyenler (naif B hücreleri) ve somatik hipermutasyon gösterdikleri halde tipik antijen seleksiyonu gösteren (GM de T hücrelerine bağlı immun yanıt sonucu gelişenler) ve göstermeyenler (erken memory hücreleri?? yada T hücre bağımsız antijen yanıtı sonucu oluşan memory hücreleri?? ). Bu bulgu GM de T hücrelerine bağımlı gelişen antijen yanıtı sonunda oluşan tüm memory hücrelerinin dolaşıma katılmadıklarını bir bölümünün marginal zone geri döndüğünü gösterir.

Naif B hücreleri kemik iliğini terk edip postkapillervenüllerle sekonder lenfoid dokulara geldiklerinde ya resirküle eden B hücre havuzuna geçerler yada taşıdıkları antijen reseptörüne uyan antijeni tanıyarak aktive olurlar. Bu tanıma olayı antijen sunan hücreler (ASH ) aracılığı ve T hücre yardımı ile gelişebileceği gibi doğrudan da olabilir.

T hücre yardımı gerektirmeyen antijen tanımasında, antijeni işlemeyen geçmeden doğrudan tanıyan B hücreleri IgM oluşturan plazma hücrelerine dönüşürler. Bu plazma hücrelerinde IgVH genlerinde somatik mutasyonlar yoktur yada çok azdır. Plazma hücrelerine dönüşümle birlikte sIgD ile birlikte pan-B antijenleri kaybolur. Sekretuar sitoplazmik IgM birikir. Bu döneme denk düşen lenfoma *plazmasitoid/lenfositik lenfoma ve Waldenström makroglobulinemisi*dir.

**Germinal Merkez (GM) reaksiyonu:** B hücrelerinin antijen tanımalarının zenginleşmesi ve antijene çok daha spesifik olarak bağlanacak B hücrelerinin oluşumu, antijenik uyarılardan sonra sekonder lenfoid organlarda gelişir. İnsanlarda ve farelerde bu olayı sağlayacak somatik hipermutasyon mekanizmaları lenfoid folikülün oldukça özgün mikroçevresi içinde T hücrelerine bağımlı olarak gelişmektedir. GM lerde gerçekleşen bu yanıt sekonder B hücre repertuarının gelişimini sağlar.

Deneyisel çalışmalar, antijenle ilk karşılaşmadan 3-7 gün sonra T hücrelerine bağlı GM reaksiyonunun geliştiğini göstermektedir. Para-korteks



hücreleri). *Burkitt lenfomasının* IgM + erken GM blastik hücrelerinden köken aldığı yönünde deneysel çalışmalar mevcuttur.

### **Marginal zon ve Monositoid (parafoliküler) B hücreleri**

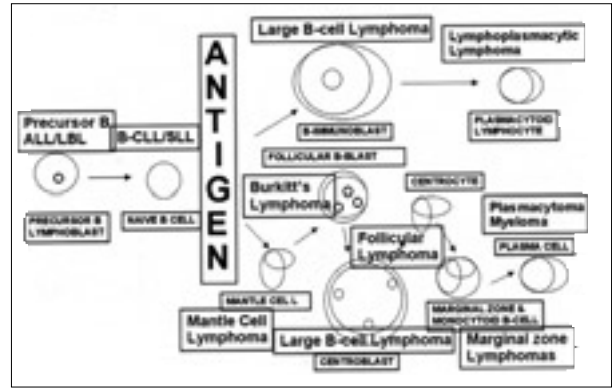
GM dark ve light zonlara polarize olmasıyla birlikte mantle bölgesi de light zonu eksantrik olarak çevrelediğinden daha iyi seçilir. GM de antijen spesifik olarak çoğalan B hücrelerinin bir bölümü GM i terk ederek mantle zon'un dışında belirirler. Bu bölge özellikle dalak, mezenterik LN ve payer plaklarında daha belirgindir. Marginal zon B hücreleri sentrositleri andıracak şekilde hafif düzensiz çekirdekli ve genişçe soluk sitoplazmalıdır. Bunlara benzeyen neoplastik hücreler içinde *sentrosit benzeri* terimi kullanılmaktadır. Antijenle tekrar karşılaşıldığında splenik marginal zon B hücreleri GM e geri dönerler ve kısa süre sonra T bölgesinde antijen spesifik plazma hücrelerine dönüşecek IgM+ blastik hücreler şeklinde belirirler, bu nedenle marginal zon hücrelerinin memory B hücreleri oldukları düşünülmektedir. Memory B hücreleri periferik kanda da bulunurlar. Dalakta marginal zon dan elde edilerek çoğaltılan tek hücre çalışmaları marginal zon hücrelerinin IgVH genlerinin mutasyona uğradıklarını, oligoklonal olup bitişik oldukları GM ile klonal ilişki göstermediklerini göstermiştir. Reaktif hiperplazilerde sub kapsüler ve subkortikal sinüslere yakın olarak bulunan ve morfolojik olarak marginal zon B lenfositlerine benzeyen hücreler *monositoid B hücreleri* olarak adlandırılır. Bu hücrelerin IgVH genlerinde mutasyon yoktur yada az sayıda tesadüfi mutasyonlar görülür. Bu bulgu monositoid B hücrelerinin antijenle seçilmediğini düşündürür. Splenik marginal zon hücreleri veya monositoid B hücrelerine benzeyen lenfoma hücrelerinin ise IgVH gen mutasyonları açısından GM hücrelerine benzedikleri gösterilmiştir.

### **Kemik iliği plazma hücreleri**

IgG sekrete eden plazma hücreleri LN medullasında toplanırlar. Bunların bir bölümü kemik iliğine geri dönerek antijen karşılaşmasındaki ilk hızlı plazma hücre öncülerini oluştururlar. Plazma hücreleri yüzey antijenleri, CD40 ve yüzey Ig lerini kaybederler CD38+ tirlir. IgVH genlerinde mutasyonlar vardır ancak bunlar hücrelerindeki gibi süregiden mutasyon olmayıp tamamlanmış mutasyonlardır (post GM hücreleri). Bu hücreler *myelom* ve *plazma hücreli tümörlere* karşılıktır.

### **Mukaza ilişkili lenfoid doku (MALT)**

B hücrelerinin bir bölümü mukozal alanlar için programlanmıştır. Payer plakları, Waldeyer halkası ve mezenterik lenf düğümlerinde antijenle karşılaştıktan sonra çoğalan ve farklılaşan lenfoid hücreler kemik iliği ve/veya lenf düğümleri yerine yine antijenle ilk karşılaştıkları mukozal lenfoid dokulara geri dönerler. Bu dokularda gelişen antijen spesifik plazma hücreleri de Kİ yerine lamina propria ya döner. MALT lenfomaları, marginal zon B hücreleri, plazma hücrelerinden oluşur. IgVH genlerinde tamamlanmış somatik mutasyonlar olup post GM hücrelerine uyar.



Şema 3: B hücre farklılaşmasında değişik evrelere ait hücrelerin anatomik bölgelerdeki yerleşimi (4 no'lu kaynaktan alınmıştır)

### **Özet ve B hücreli lenfomaların B lenfosit farklılaşma evrelerine adaptasyonu**

Kemik iliğinde antijeni spesifik olarak tanıyacak antijen reseptörü (yüzey Ig) kazanan naif (bakir) B hücreleri kemik iliğini terk ederler. Kemik iliğindeki değişik farklılaşma evrelerindeki lenfoid hücrelerden gelişen tümörler prekürsör hücreli neoplaziler olup, kemik iliği kaynaklı B hücreli akut lenfoblastik lösemileri oluştururlar. Bu evredeki immatür lenfoid hücrelerden nadirde olsa solid tümörler çıkabilir. Bunlar kısa sürede lösemik form alabilen B hücreli lenfoblastik lenfomalarıdır.

Kemik iliğini terk eden naif B hücreleri post-kapiller venüller ile periferik lenfoid dokulara gelerek lenf düğümü korteksinde primer folikülleri oluştururlar. Antijenin tanınmasından sonra T hücre destekli germinal merkez oluşumu başlar ve primer foliküldeki naif B hücreleri germinal merkezi kuşatan mantle bölgesine yerleşirler. Germinal merkez yüksek proliferatif kapasitesi olan apoptoza açık blastik hücrelerden (sentroblast) ve bunlardan farklılaşan antijen tanıma kapasiteleri artmış sentrositlerden oluşur. Antijene yanıt olarak farklı





törü), CD38 ve HLA-DR ekspresine başlar. Lenfoid dokularda T hücre aktivasyonu lenf düğümlerinde parakorteks dalakta PALS da gelişir. Aktive T hücreleri CD4 veya CD8 pozitif olup etkeni yok edecek efektör hücrelere ve bellek hücrelerine dönüşürler. Efektör hücrelerde CD45 RA , RO şekline dönüşür. Bu hücrelerin büyük çoğunluğu  $\alpha\beta$  T hücreleridir.  $\gamma\delta$  T hücreleri deri, mukoza ve dalakta bulunur.

*Periferik T hücreli lenfoma* ların antijenle aktive olan T hücrelerinden çıktıkları düşünülmeyle birlikte neoplastik ve normal T hücreleri arasındaki ilişki B hücrelerindeki kadar iyi anlaşılmamıştır. PTHL lar genellikle CD4+ hücrelerden köken alırlar. Pan T antijenlerinde kayıpların olması siktir. MF dahil deri lenfomaları ve hepatosplenik  $\gamma\delta$  lenfomalarda THR  $\gamma\delta$  genlerinde klonal düzenlenmeler görülür.

### **NK hücreleri**

Bu hücrelerde timustaki öncülerden gelişirlet T hücrelerinden farklı olarak antijen tanımalarında MHC kısıtlılığı yoktur. NK hücreleri, hücre yüzeyindeki self klas I MHC moleküllerini tanır ve bu molekülü taşımayan hücreleri lizis ile öldürür.

İmmatür NK hücreleri sitoplazmik CD3 içermekle birlikte TCR genlerinde yeniden düzenlenme ve yüzey CD3 göstermezler.

NK hücreleri CD16, CD56 ve CD57 gibi yüzey antijenleri ve CD2, CD8 ve CD28 gibi bazı T hücre antijenleri taşır. Periferik kanda az sayıda bulunurlar. Morfoljik olarak normal lenfositlerden biraz daha büyük olup granüllü ve geniş soluk sitoplazmalıdırlar.

Prekürsör hücreler *agesif NK hücreli lenfoblastik lenfoma*, periferik immatür NK hücreler *anjiosentrik veya nazal NK hücreli lenfoma*, matür NK hücreler *büyük granüler hücreli lenfositik lösemi* lerin karşılığıdır.

### **Özet ve T hücreli lenfomaların B lenfosit farklılaşma evrelerine adaptasyonu**

Kemik iliğinden timusa gelen immatür timositler farklı antijenleri spesifik olarak tanıyacak TCR ne sahip naif T hücrelerine dönüşürler. Antijeni kendi MHC si üzerinde tanıyacak (pozitif), ve kendi küreleriyle reaktif (negatif) timositler seçildikten sonra timusu terk etmeye hazırdırlar (Şema 1). Bu gelişim evrelerindeki T hücrelerinin neoplastik karşılıkları prekürsör hücreli neoplaziler olup, T hücreli akut lenfoblastik lösemi ve T hücreli lenfoblastik lösemidir. Timustaki prekürsör NK hücreleri de

NK hücreli lenfoblastik lenfoma/lösemi karşılığıdır.

Post kapiller venüllerle Timus medullasını terk eden naif T hücreleri periferik lenfoid organlarda T bölgelerine yerleşirler. Bu hücrelerin neoplastik karşılığı T hücreli KLL ve prolenfositik lösemidir. Antijenle karşılaştıktan sonra T hücrelerindeki gerek morfolojik gerekse immunfenotipik değişimler B hücrelerindeki gibi bilinmemektedir. Antijenle karşılaşım aktive olan T hücrelerinin neoplastik karşılıkları periferik T hücreli lenfomalar(NOS), mycosis fungoides dir (Şema 3).

### **KAYNAKLAR**

1. Haris NL and Ferry J: Classification of non-Hodgkin's lymphomas. In Neoplastic hematopathology. Ed:Knowles DM. 2nd Ed. P: 691-753. Lippincott, Williams&Wilkins 2001.
2. Wolf-Peeters C, Tierens A, Achten R: Normal histology and immunoarchitecture of the lymphohemopoietic system. Ed:Knowles DM. 2nd Ed. P: 271-305. Lippincott, Williams&Wilkins 2001.
3. MacLennan I: Germinal centers. Annu Rev Immunol, 12:117-139, 1994
4. Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Wardiman JW: Tumours of hematopoietic and lymphoid tissues. Pathology&genetics. WHO classification of tumours.IARC pres. Lyon 2001.
5. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS: Cellular and molecular immunology. 4th ed. W.B. Saunders Company. London, NewYork, Sydney, Toronto, 2000.