

RAFAŁ RUDZIŃSKI<sup>1</sup>, JADWIGA BANACH<sup>1</sup>, KRZYSZTOF SAFRANOW<sup>2</sup>,  
KATARZYNA JAKUBOWSKA<sup>2</sup>, MARIA OLSZEWSKA<sup>3</sup>, ELŻBIETA DEMBOWSKA<sup>1</sup>,  
AGNIESZKA DROŹDZIK<sup>1</sup>, MAŁGORZATA MAZUREK-MOCHOL<sup>1</sup>, DARIUSZ CHLUBEK<sup>2</sup>

## Nikotyna i jej główne metabolity a wybrane parametry periodontologiczne w ocenie narażenia na dym tytoniowy pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia\*

### Nicotine, its major metabolites and selected periodontal parameters in the assessment of exposure to tobacco smoke of patients with chronic periodontitis

<sup>1</sup>Zakład Periodontologii, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

<sup>2</sup>Zakład Biochemii Katedry Biochemii i Chemii Medycznej, Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

<sup>3</sup>Zakład Chemii Medycznej Katedry Biochemii i Chemii Medycznej Pomorskiego Uniwersytetu Medycznego w Szczecinie

#### Streszczenie

**Wprowadzenie.** Ekspozycja na dym tytoniowy jest uznanym czynnikiem ryzyka zapaleń przyzębia. Jest on niestabilnym aerozolem w krótkim czasie zmieniającym swe właściwości chemiczne. Poszukuje się składowych dymu tytoniowego będących swoistymi i czułymi markerami narażenia osób ekspozowanych oraz nowych metod analityczno-toksykologicznych.

**Cel pracy.** Określenie związków stężeń nikotyny i jej głównych metabolitów, tj.: kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi, z wybranymi parametrami periodontologicznymi u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, palących i niepalących tytoń.

**Materiał i metody.** Badaniem objęto 199 pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, których podzielono na dwie grupy: 101 pacjentów, nigdy niepalących papierosów oraz 98 nałogowych palaczy tytoniu. Pacjenci zostali zakwalifikowani do badań po szczegółowej klinicznej analizie wybranych wskaźników stanu przyzębia oraz parametrów periodontologicznych. Materiał biologiczny do badań biochemicznych stanowiła surowica krwi pobieranej od każdego pacjenta zakwalifikowanego do badań. Badania biochemiczne dotyczyły określenia obecności i stężeń nikotyny, kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi, jako markerów narażenia na dym tytoniowy, metodą wysoko sprawnej chromatografii cieczowej (HPLC).

**Wyniki.** Zaobserwowano istotnie statystycznie gorsze wartości wskaźników i parametrów klinicznych przyzębia u pacjentów nałogowo palących tytoń względem pacjentów nieekspozowanych, poza wskaźnikiem krwawienia z kieszonki przyzębnej (mSBI%), który u pacjentów nałogowo palących przyjmował wartości istotnie niższe. Wykazano ponadto obecność nikotyny i jej metabolitów w surowicy krwi badanych pacjentów nałogowo palących, przy czym największe stężenia w badanym materiale osiągnęła kotynina.

**Wnioski.** Badanie stężeń podstawowych metabolitów nikotyny, szczególnie kotyniny, może być obiektywną oceną narażenia na dym tytoniowy oraz weryfikację danych pochodzących z kwestionariuszy i ankiet określających status palenia tytoniu u pacjentów kwalifikowanych do badań naukowych (**Dent. Med. Probl. 2011, 48, 3, 00-00**).

**Słowa kluczowe:** nikotyna, kotynina, 3'-hydroksykotynina, zapalenie przyzębia.

#### Abstract

**Background.** Exposure to tobacco smoke is a recognized risk factor for periodontal inflammation. It is an unstable aerosol changing its chemical properties in a short time. There is an ongoing search for components of tobacco smoke which are specific markers of the exposure and the new methods of analytical toxicology.

\* Grant PAM-02/07/PB, MNiSW NR 403 034 32/2046

**Objectives.** Determining the associations between concentrations of nicotine and its major metabolites: cotinine and 3'-hydroxycotinine in serum, and selected periodontal parameters in patients with chronic periodontitis, including tobacco smokers and non-smokers.

**Material and Methods.** The study included 199 patients with chronic periodontitis divided into two groups: 101 never smoking patients and 98 heavy smokers of tobacco. Patients were enrolled in the study after a detailed clinical examination of selected indicators of periodontal status and periodontal parameters. Material for biochemical studies was serum of blood collected from each patient qualified for the study. Biochemical studies related to determining the presence and concentrations of nicotine, cotinine and 3'-hydroxycotinine in serum, as markers of exposure to tobacco smoke, by high-performance liquid chromatography (HPLC).

**Results.** Significantly worse indices and clinical parameters of periodontum have been observed in heavy smokers relative to never smoking patients, with the exception of an indicator of periodontal pocket bleeding (mSBI%) which was significantly lower in smokers. In addition, the presence of nicotine and its metabolites was demonstrated in blood serum of the patients studied, with cotinine reaching the highest concentrations.

**Conclusions.** The measurement of concentrations of primary metabolites of nicotine, cotinine in particular, can provide an objective assessment of exposure to tobacco smoke and verification of data from questionnaires and surveys to determine the status of smoking patients eligible for research (**Dent. Med. Probl.** 2011, 48, 3, 00-00).

**Key words:** nicotine, cotinine, 3'-hydroxycotinine, periodontitis.

Dym tytoniowy jest to ogólne określenie dymu pochodzącego ze spalania tytoniu zawartego w papierosach, cygarach, cygaretkach i fajce. Jest niestabilnym aerozolem, w krótkim czasie zmieniającym swoje chemiczne właściwości. Składa się z dwóch faz: gazowej i cząsteczkowej. Fazę gazową stanowią lotne związki, m.in.: tlenek węgla, cyjanowodór, akroleina oraz tlenki azotu. Fazę cząsteczkową natomiast stanowią substancje smołiste. Największą ich grupą są wielopierścieniowe węglowodory aromatyczne, jak: benzopiren, benzenoantracen, inden, fluoren, perylen. Obecne w dymie są również fenole i ich estry, kwasy, aldehydy, alkohole, ketony oraz wiele metali ciężkich, np.: tal, arsen, ołów, antymon, bizmut, tellur, polon, lantan, chrom, mangan, żelazo, kobalt, nikiel, miedź, srebro, złoto, cynk, kadm i rtęć. Wszystkie te związki są uznane za szczególnie aktywne i potencjalnie toksyczne dla ustroju człowieka, w tym dla tkanek przyzębia [1]. Jednym z najbardziej poznanych składowych dymu tytoniowego jest nikotyna. Liście *Nicotiana tabacum* zawarte w suszu tytoniowym stanowią jedyne znaczące ilościowo, dla człowieka, źródło nikotyny. Chemicznie jest ona pirydynowym alkaloidem. Absorbowana z dymem tytoniowym podlega intensywnym procesom biotransformacji, głównie w wątrobie. Nadrzędnym szlakiem przemian nikotyny w organizmie człowieka jest C-utlenianie. Około 80% nikotyny jest metabolizowane do kotyniny. Ta następnie ulega dalszym przemianom, głównie do trans-3'-hydroksykotyniny. Jedyne śladowa jej ilość jest metabolizowana do stereoisomeru cis-3'-hydroksykotyniny. W następstwie 3'-hydroksykotynina jest wydalana z moczem, w większości w postaci wolnej, a pozostała część jest sprzęgana z kwasem glukuronowym. Metabolizm nikotyny u człowieka przebiega z zaangażowaniem nieswoistych monoooksygenaz cytochromu P-450. Dotychczasowe badania dowodzą, iż

ekspozycję na dym tytoniowy można oszacować na podstawie pomiaru zawartości w nim danej substancji. Przed laty nikotyne uznano za swoisty i specyficzny marker narażenia na dym tytoniowy, głównie ze względu na możliwość oznaczenia jej w różnych płynach ustrojowych jak: krew, mocz, ślina, nasienie, płyn mózgowo-rdzeniowy lub płyn owodniowy. Obecnie uważa się, że mimo iż nikotyna jest wysoce swoista dla palenia tytoniu, to nie spełnia wymogów dobrego biomarkera, zwłaszcza przy długotrwałym narażeniu na dym tytoniowy, z uwagi na stosunkowo krótki okres półtrwania w płynach ustrojowych [2].

Celem pracy jest określenie związków stężeń nikotyny i jej głównych metabolitów tj.: kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi z wybranymi parametrami periodontologicznymi u pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, palących i niepalących tytoń.

## Materiał i metody

Badaniem objęto 199 pacjentów dorosłych w wieku 24-74 lat (117 kobiet i 82 mężczyzn) z przewlekłym zapaleniem przyzębia (CP). Przeprowadzono badanie kliniczne, w wyniku którego zakwalifikowano pacjenta do danej grupy (palących lub niepalących). Po postawieniu rozpoznania CP zmierzono wybrane wskaźniki i parametry periodontologiczne oraz pobrano materiał biologiczny do analizy biochemicznej. Badanie biochemiczne dotyczyło analizy obecności i stężeń głównych metabolitów nikotyny w surowicy krwi pacjentów badanych grup. Diagnozę kliniczną oparto na stosowanej obecnie klasyfikacji Europejskiej Federacji Periodontologicznej zmodyfikowanej podczas warsztatów periodontologicznych AAP w 1999 r. [3]. Celem właściwej kwalifikacji pacjentów do grupy badanej i kontrolnej na podstawie wywiadu

stomatologicznego i ogólnomedycznego wykluczono osoby z towarzyszącymi chorobami ogólnoustrojowymi, przyjmujące leki oraz pacjentów zgłaszających występowanie zapalenia przyzębia w rodzinie.

Pierwsza grupa (I) to 98 nałogowych palaczy (P) w wieku 24-71 lat (średnia wieku 49 lat; 61,22% kobiet, 38,78% mężczyzn), tj. pacjentów palących od min. 5 lat bez przerwy, min. 10 papierosów dziennie.

Drugą grupę (II) stanowiło 101 pacjentów z przewlekłym zapaleniem przyzębia, nigdy niepalących papierosów (NP) w wieku 26-74 lat (średnia wieku 50 lat; 56,44% kobiet, 43,56% mężczyzn). Była ona jednocześnie grupą kontrolną.

Nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie między pacjentami poszczególnych grup pod względem płci ( $p = 0,56$ ) i wieku ( $p = 0,86$ ).

Pomiarów klinicznych dokonano w jednorodnych warunkach gabinetu stomatologicznego. Oceniano: wskaźnik higieny jamy ustnej API% wg Lange'go et al. [4], zmodyfikowany wskaźnik krwawienia z kieszonki przyzębnej mSBI% wg Mühlemanna i Sona [5], głębokość kieszonek przyzębnych (PD – *probing depth*, w mm) i utratę przyczepu łącznotkankowego (CAL – *clinical attachment lost*, w mm, sondą WHO 621), odsetek zębów trzonowych z otwartą przestrzenią międzykorzeniową (z głębnikiem Nabersa) oraz odsetek zębów z patologiczną ruchomością (aparatem Periotest). Oceniano ponadto liczbę zębów utraczonych z powodu zapalenia przyzębia (LZU).

Pomiarów PD i CAL dokonywano w 4 punktach pomiarowych zęba: mezialnie-M, centralnie od strony przedsionkowej-B i podniebiennej-P oraz dystalnie – D względem linii pośrodkowej wyznaczanej przez zęby sieczne przyśrodkowe. Metodę badawczą szczegółowo przedstawiono w innej pracy [6].

Materiał biologiczny do badań biochemicznych stanowiła surowica krwi otrzymana po odwirowaniu 10 ml krwi pełnej, pobieranej bezpośrednio z żyły łokciowej od każdego pacjenta zakwalifikowanego do badań. Do oznaczenia obecności i stężeń nikotyny, kotyniny i 3'-hydroksykotyniny zastosowano metodę wysoko sprawnej chromatografii cieczowej - High Performance Liquid Chromatography (HPLC) z detekcją nadfioletu (UV).

Próbkę 500  $\mu$ L surowicy umieszczano w plastikowej probówce 1,5 mL (Eppendorf) i dodawano jako standardu wewnętrznego 50  $\mu$ L roztworu 2-fenylimidazolu o stężeniu 600  $\mu$ g/L rozpuszczonego w mieszaninie metanolu i kwasu solnego (10 : 90 v/v). Następnie dodawano 500  $\mu$ L wodnego roztworu kwasu trichlorooctowego o stężeniu 100 g/L i zawartość intensywnie mieszano na wortexie przez 30 s. Próbkę wirowano przez 20 min

przy 20000 g, a następnie pobierano pipetą 800  $\mu$ L supernatantu do szklanej próbówki zawierającej 250  $\mu$ L wodnego roztworu wodorotlenku potasu o stężeniu 5 mol/L. Dodawano 3 mL mieszaniny chlorku metylenu z izopropanolem (90 : 10 v/v) i próbówki wytrząsano z maksymalną intensywnością (Heidolph Vibramax 110) przez 15 min, a następnie wirowano przez 5 min przy 2000 g. Z dolnej warstwy cieczy przenoszono strzykawką (Hamilton) 2,5 mL fazy organicznej do nowej próbówki szklanej zwracając szczególną uwagę, aby nie pobrać fazy wodnej z górnej warstwy. Dodawano do niej 100  $\mu$ L roztworu kwasu solnego o stężeniu 10 mmol/L w metanolu i mieszano na vortexie przez 15 s. Roztwór odparowywano strumieniem azotu w ciągu ok. 30 min. Do próbówki po odparowaniu dodawano 200  $\mu$ L roztworu kwasu solnego o stężeniu 10 mmol/L w metanolu i mieszano na wortexie przez 30 s, aby rozpuścić osad ze ścianek. Roztwór odparowywano strumieniem azotu w ciągu ok. 10 min, a osad rozpuszczano w 50  $\mu$ L fazy ruchomej HPLC, mieszając na wortexie przez 15 s. 25  $\mu$ L roztworu przenoszono do fiolki autosamplera i do czasu analizy przechowywano w  $-80^{\circ}\text{C}$ .

Roztwory kalibracyjne przygotowano z wzorcowych roztworów nikotyny (N5511, Sigma) i kotyniny (C0430, Sigma), a krystaliczną trans-3'-hydroksykotyninę (H9040-50, USBiological) rozpuszczano w metanolu. Roztwory wyjściowe o stężeniu 200 mg/L w metanolu rozcieńczano następnie mieszaniną metanol : 50 mmol/L kwas solny (10 : 90 v/v) do zakresu stężeń 200-12000  $\mu$ g/L. Próby kalibracyjne preparowano, mieszając 25  $\mu$ L każdego ze wzorców z 500  $\mu$ L wody zamiast surowicy, uzyskując stężenia odpowiadające zakresowi 10-600  $\mu$ g/L w surowicy. W celu kontroli jakości analizowano również próbki zerowe (zawierające wzorec wewnętrzny, a niezawierające surowicy ani dodanych wzorców) oraz próbki nie zawierające wzorca wewnętrznego.

Do analizy chromatograficznej zastosowano chromatograf cieczowy Agilent 1200 z poczwórną pompą gradientową, modułem próżniowego odgazowania buforów, chłodzonym autosamplerelem, przedziałem termostatowania kolumny i detektorem diodowym (DAD). Rozdział prowadzono izokratycznie na kolumnie Luna C18(2), o wymiarach 150 x 3 mm i średnicy ziarna 3  $\mu$ m. Jako fazę ruchomą zastosowano mieszaninę zawierającą 30 mmol/L diwodorofosforanu potasowego, 30 mmol/L jednowodnego kwasu cytrynowego, 1 mmol/L heptanosulfonianu sodu oraz 8% (v/v) acetonitrylu o pH równym 5,5. Przed użyciem roztwór filtrowano przez filtr o porach 0,2  $\mu$ m (Nylon 66, Supelco). Przepływ fazy ruchomej wynosił 0,5 mL/min, temperatura kolumny  $40^{\circ}\text{C}$ , a detekcję pro-

wadzano przy długości fali 260 nm, oceniając dla każdego z pików badanych związków czystość na podstawie widma absorpcji UV (DAD) w zakresie 220-350 nm. Próbkę do czasu analizy były schłodzone w autosamplerze do 4°C, a objętość nastrzyku wynosiła 20 µL. Między nastrzykami igłę autosamplera płukano 3-krotnie w mieszaninie acetonitrylu z wodą (50:50 v/v). Czasy retencji wynosiły: 3,6 min dla trans-3'-hydroksykotyniny, 4,0 min dla nikotyny, 7,1 min dla kotyniny i 11,9 min dla standardu wewnętrznego, a kolejne analizy wykonywano co 15 min. Granice detekcji metody przy stosunku sygnał/szum równym 3 wynosiły: 3 µg/L dla trans-3'-hydroksykotyniny, 2 µg/L dla nikotyny oraz 1 µg/L dla kotyniny.

Badania zostały zatwierdzone przez Komisję Bioetyczną Pomorskiej Akademii Medycznej w Szczecinie uchwałą nr BN-001/89/06 z dnia 21 czerwca 2006 r. Wszystkie osoby biorące udział w badaniach wyraziły zgodę na ich przeprowadzenie oraz zostały poinformowane o zakresie i celu badania.

Otrzymane wyniki badań klinicznych poddano analizie statystycznej z użyciem pakietu komputerowego Statistica Pl 7.1. Rozkłady większości analizowanych zmiennych mierzalnych istotnie odbiegały od rozkładu normalnego (test Shapiro-Wilka), dlatego zastosowano metody nieparametryczne: test Manna-Whitneya dla porównań między grupami oraz współczynnik korelacji rang Spearmana (Rs) dla oceny korelacji między zmiennymi.

Jako próg istotności statystycznej przyjęto wartość  $p < 0,05$ .

## Wyniki

Porównanie higieny jamy ustnej za pomocą wskaźnika API (%) i rozległości stanu zapalnego dziąseł z użyciem zmodyfikowanego wskaźnika krwawienia (SBI%) w grupie pacjentów palących (P) i niepalących papierosów (NP) z zapaleniem przyzębia przewlekłym przedstawiono w tabeli 1. Średnia wartość wskaźnika API(%) w grupie pacjentów niepalących tytoń (NP) to 69,9% ( $\pm 19,2$ ), a w grupie pacjentów nałogowo palących papierosy (P) 85,2% ( $\pm 11,9$ ),  $p < 0,0001$  (tab. 1).

Wskaźnik krwawienia z kieszonki przyzębnej (mSBI%) w grupie nałogowo palących tytoń (P) był istotnie niższy w porównaniu z grupą pacjentów niepalących (NP). W grupie palaczy (P) wynosił 12,5% ( $\pm 7,2$ ), a w grupie niepalących (NP) 62,4% ( $\pm 18,6$ ). Wartość (mSBI%) była więc istotnie wyższa u pacjentów z zapaleniem przyzębia przewlekłym nigdy niepalących,  $p < 0,0001$ , (tab. 1).

Średnia wartość PD u pacjentów niepalących (NP) wynosiła 4,4 mm ( $\pm 0,9$ ), a u osób nałogowo

palących (P) - 5,4 mm ( $\pm 1,1$ ),  $p < 0,0001$ . Średnia zaś wartość utraty CAL u pacjentów niepalących to 6,8 mm ( $\pm 1,7$ ), a u osób nałogowo palących - 8,5 mm ( $\pm 2,0$ ),  $p < 0,0001$ , (tab. 1).

Odsetek osób z ubytkiem kości w przestrzeniach międzykorzeniowych w grupie osób niepalących (NP) wynosił średnio 3,1% ( $\pm 5,4$ ), a w grupie osób nałogowo palących tytoń (P) był prawie 3-krotnie wyższy, wynosząc średnio 8,5% ( $\pm 8,8$ ),  $p < 0,0001$ , (tab. 1).

Tabela 1 przedstawia również porównanie odsetka posiadanych zębów wykazujących klinicznie ruchomość od pierwszego do trzeciego stopnia w grupie osób z zapaleniem przyzębia przewlekłym niepalących (NP) oraz nałogowo palących (P) tytoń. Różnice między badanymi grupami pacjentów były wysoce istotne statystycznie, bowiem średni odsetek zębów wykazujących kliniczną patologiczną ruchomość wyrażoną 1, 2 lub 3 stopniem w grupie pacjentów niepalących (NP) wynosił 19,8% ( $\pm 17,9$ ), a w grupie pacjentów nałogowo palących (P) był o około połowę wyższy, wynosząc aż 35,7% ( $\pm 21,2$ ),  $p < 0,0001$ .

Mediana i rozstęp kwartyłowy (Q1-Q3) liczby zębów utraconych (LZU) w grupie pacjentów niepalących (NP) wynosiła 7 (4-10), a w grupie pacjentów nałogowo palących tytoń (P) 8,5 (6-12),  $p = 0,014$ . Grupę pacjentów nałogowo palących tytoń z zapaleniem przyzębia przewlekłym charakteryzowała więc wyższa wartość liczby zębów utraconych w porównaniu z grupą pacjentów niepalących (tab. 1).

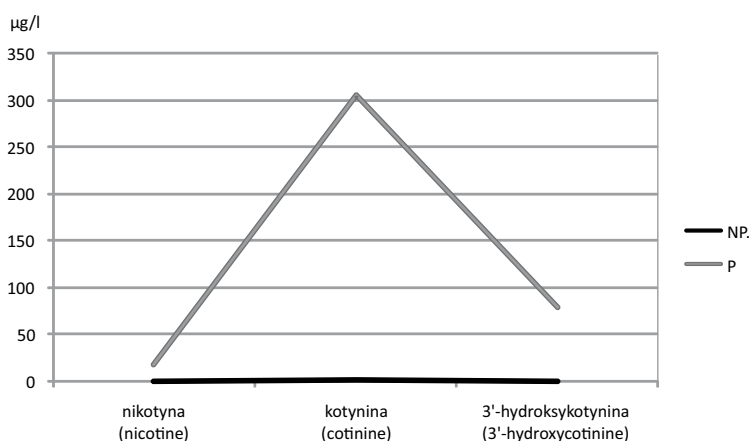
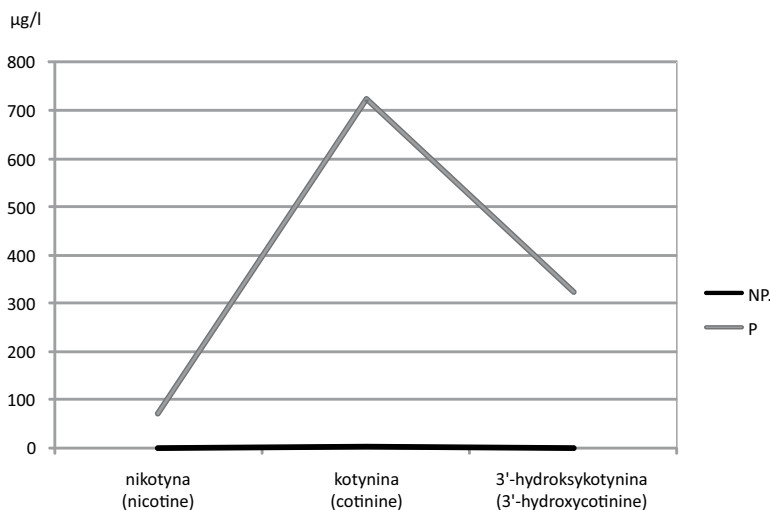
Badania biochemiczne surowicy krwi w grupie pacjentów niepalących tytoń (NP) z zapaleniem przyzębia przewlekłym wykazały następujące średnie wartości stężeń: nikotyny - 0,0447 µg/l; kotyniny - 0,5195 µg/l i 3'-hydroksykotyniny - 0,0920 µg/l. W grupie natomiast pacjentów nałogowo palących papierosy (P) z zapaleniem przyzębia przewlekłym średnie stężenia kształtowały się na poziomie: nikotyny - 18,2751 µg/l, kotyniny - 305,1568 µg/l i 3'-hydroksykotyniny - 91,1109 µg/l,  $p < 0,00001$ , (ryc. 1).

Zanalizowano również kształtowanie się wartości maksymalnych stężeń nikotyny i jej metabolitów w surowicy krwi obu badanych grup (ryc. 2).

W grupie pacjentów niepalących papierosów (NP) z zapaleniem przyzębia przewlekłym maksymalne stężenie nikotyny w surowicy krwi wyniosło 4,5157 µg/l, stężenie kotyniny - 14,0056 µg/l a stężenie 3'-hydroksykotyniny - 6,6352 µg/l. W grupie pacjentów nałogowo palących tytoń (P) z zapaleniem przyzębia przewlekłym natomiast maksymalne stężenie nikotyny w surowicy krwi wyniosło 77,3314 µg/l; stężenie kotyniny - 726,5404 µg/l, a stężenie 3'-hydroksykotyniny - 323,6445 µg/l,  $p < 0,00001$  (ryc. 2).

**Tabela 1.** Różnice parametrów periodontologicznych w grupie pacjentów palących (P) i niepalących (NP) tytoń z przewlekłym zapaleniem przyzębia**Table 1.** Differences in periodontal parameters in smokers (P) and non smokers (NP) with chronic periodontitis

Wskaźniki stanu przyzębia (Periodontal status indicators)	Niepalący (n = 101) (Non-smokers)		Palący (n = 98) (Smokers)		Istotność statystyczna (Statistical significance)
	Średnia ± SD (Average)	Mediana (Q1-Q3) (Median)	Średnia ± SD (Average)	Mediana (Q1-Q3) (Median)	
API% (Approximal plaque index)	69,9 ± 19,2	70 (55-84)	85,2 ± 11,9	85 (77-98)	p < 0,0001
MSBI% (Sulcus bleeding index)	62,4 ± 18,6	62 (54-78)	12,5 ± 7,2	12 (8-18)	p < 0,0001
PD (Probing depth)	4,4 ± 0,9	4,2 (3,8-4,8)	5,4 ± 1,1	5,2 (4,7-6,1)	p < 0,0001
CAL (Clinical attachment lost)	6,8 ± 1,7	6,8 (5,8-7,7)	8,5 ± 2,0	8,7 (7,3-10,2)	p < 0,0001
FURK I-III(%) (Furcations)	3,1 ± 5,4	0 (0-4,5)	8,5 ± 8,8	8,3 (0-14,8)	p < 0,0001
RUCH 1-3(%) (Teeth mobility)	19,8 ± 17,9	14,8 (7,1-27,3)	35,7 ± 21,2	30,6 (21-50)	p < 0,0001
LZU (Teeth lost)	7,5 ± 4,5	7 (4-10)	9,2 ± 4,8	8,5 (6-12)	p = 0,014

**Ryc. 1.** Porównanie średnich stężeń (µg/l) nikotyny i jej metabolitów, tj.: kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi pacjentów niepalących (NP) i palących (P) z przewlekłym zapaleniem przyzębia, p < 0,00001 dla każdego związku**Fig. 1.** Comparison of average concentrations (µg/l) of nicotine and its metabolites: cotinine and 3'-hydroxycotinine in serum of non smokers (NP) and smokers (P) with chronic periodontitis, p < 0.00001 for each compound**Ryc. 2.** Porównanie maksymalnych stężeń (µg/l) nikotyny i jej metabolitów, tj.: kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi pacjentów niepalących (NP) i palących tytoń (P) z przewlekłym zapaleniem przyzębia, p < 0,00001 dla każdego związku**Fig. 2.** Comparison of maximum concentrations (µg/l) of nicotine and its metabolites: cotinine and 3'-hydroxycotinine in serum of non smokers (NP) and smokers (P) with chronic periodontitis, p < 0.00001 for each compound

**Tabela 2.** Korelacja porządku rang Spearmana (Rs) między parametrami klinicznymi stanu przyzębia a stężeniami nikotyny i jej metabolitów w surowicy krwi u osób nałogowo palących tytoń z przewlekłym zapaleniem przyzębia

**Table 2.** Spearman's rank correlation coefficients (Rs) between the clinical parameters of periodontal status and the concentrations of nicotine and its metabolites in serum of people addicted to smoking tobacco (P) with chronic periodontitis

Wskaźniki i parametry kliniczne stanu przyzębia (Indicators and clinical periodontal parameters)		Nikotyna (Nicotine)		Kotynina (Cotinine)		3'-hydroksy-kotynina (3'-hydroxycotinine)	
		Rs	Istotność statystyczna (Statistical significance)	Rs	Istotność statystyczna (Statistical significance)	Rs	Istotność statystyczna (Statistical significance)
Wiek (age)		+0,08	p = 0,4263	+0,13	p = 0,1870	+0,17	p = 0,1003
API% (approximal plaque index)		+0,04	p = 0,6887	+0,06	p = 0,5361	+0,09	p = 0,3949
SBI% (sulcus bleeding index)		-0,21	p = 0,0342	-0,40	p = 0,0001	-0,23	p = 0,0264
PD (probing depth)	D (Distal)	+0,36	p = 0,0002	+0,08	p = 0,4341	+0,03	p = 0,7739
	P (Palatal)	+0,20	p = 0,0490	-0,08	p = 0,3796	-0,16	p = 0,0952
	B (Buccal)	+0,17	p = 0,0862	-0,11	p = 0,2913	-0,15	p = 0,1393
	M (Mesial)	+0,33	p = 0,001	+0,04	p = 0,6629	+0,02	p = 0,8163
PD	DPBM (All surfaces)	+0,30	p = 0,0026	-0,05	p = 0,6235	-0,10	p = 0,3192
CAL (Clinical attachment lost)		+0,02	p = 0,8128	-0,15	p = 0,1416	-0,21	p = 0,0374
FURK I-III(%) (Furcations)		-0,06	p = 0,5604	+0,05	p = 0,5952	+0,08	p = 0,4259
RUCH 1-3(%) (Teeth mobility)		-0,10	p = 0,3183	-0,06	p = 0,5419	-0,01	p = 0,9334
LZU (Teeth Lost)		-0,09	p = 0,3638	-0,18	p = 0,0667	-0,17	p = 0,0867
Nikotyna (Nicotine)		X	X	+0,71	p = 0,0001	+0,35	p = 0,0004
Kotynina (Cotinine)		+0,71	p = 0,0001	X	X	+0,45	p = 0,0001
3'hydroksykotynina (3'-Hydroxycotinine)		+0,35	p = 0,0004	+0,45	p = 0,0001	X	X

Analizie poddano również wzajemne korelacje według rang Spearmana (Rs) między wybranymi wskaźnikami stanu przyzębia i parametrami klinicznymi tkanek przyzębia ze stężeniami nikotyny, kotyniny i 3'-hydroksykotyniny w surowicy krwi nałogowych palaczy (P) z przewlekłym zapaleniem przyzębia. Zależności te przedstawia tabela 2.

Analiza wykazała w większości dodatnie korelacje nikotyny i jej metabolitów z wybranymi parametrami klinicznymi tkanek przyzębia. Istotna statystycznie okazała się także ujemna korelacja wskaźnika krwawienia z kieszonki przyzębnej (mSBI%) z nikotyną, na poziomie  $R_s = -0,21$ ,  $p = 0,03$  i jej metabolitami: kotyniną ( $R_s = -0,40$ ,  $p = 0,0001$ ) i 3'-hydroksykotyniną ( $R_s = -0,23$ ,  $p = 0,03$ ).

Spośród wybranych parametrów klinicznych tkanek przyzębia jedynie parametr głębokości kieszonek przyzębnych PD wykazał istotną statystycznie dodatnią korelację ze stężeniem nikotyny zawartej w surowicy krwi pacjentów palących tytoń. Głębokość kieszonek przyzębnych mierzonych dystalnie (D) oraz mezjalnie (M) na

powierzchni zębów w przestrzeni międzyzębowej ze stężeniem nikotyny wykazała najistotniejszą, dodatnią korelację ( $R_s = +0,36$ ,  $p = 0,0002$  dystalnie i  $R_s = +0,33$ ,  $p = 0,001$  mezjalnie). Głębokość kieszonek przyzębnych mierzonych we wszystkich miejscach pomiarowych (DPBM) na powierzchni analizowanych zębów w szczęce i zuchwie także wykazała dodatnią korelację ze stężeniem nikotyny ( $R_s = +0,30$ ,  $p = 0,002$ ). Nikotyna ponadto koreluje silniej z kotyniną ( $R_s = +0,71$ ,  $p = 0,0001$ ) niż z 3'-hydroksykotyniną ( $R_s = +0,35$ ,  $p = 0,0004$ ). Pozostałe zależności przedstawiono w tabeli 2.

## Omówienie

Palenie tytoniu, obok czynników niemodyfikowalnych, jest jednym z właściwych czynników ryzyka zapalenia przyzębia. W poszukiwaniu markerów narażenia na dym tytoniowy przeprowadzono badania analizujące składowe dymu tytoniowego. Niestety, większość z nich, jak np.: szcze-

gólnie toksyczny tlenek węgla czy cyjanowódor, to markery niespecyficzne, ponieważ powstają w wyniku wielu fizjologicznych przemian metabolicznych zachodzących w organizmie [1, 2]. Miano biologicznego markera narażenia tkanek ustroju ludzkiego na dym tytoniowy uzyskała nikotyna, do oceny zarówno biernej jak i czynnej ekspozycji na działanie dymu tytoniowego. Jest ona markerem wysoce specyficznym, ponieważ powstaje wyłącznie w wyniku reakcji wynikających ze spalania tytoniu i nie powstaje na drodze innych przemian zachodzących w organizmie człowieka. Okres biologicznego półtrwania nikotyny w osoczu jest jednak stosunkowo krótki i wynosi zaledwie ok. 2 godz. Jest zatem wskaźnikiem nietrwałym, szybko ulegającym biotransformacji. Zdecydowanie lepszym wskaźnikiem dla biochemicznej analizy jest kotynina, jeden z głównych, bezpośrednich metabolitów nikotyny. Charakteryzuje się ona znacznie dłuższym okresem biologicznego półtrwania, wynoszącym nawet do 48 godz. Z uwagi na długi okres połowicznego rozpadu kotynina została uznana za najbardziej trwałą i czuły marker narażenia organizmu, w tym i tkanek przyzębia na dym tytoniowy. Inny ilościowy metabolit nikotyny, 3'-hydroksykotynina charakteryzuje się stosunkowo krótkim okresem półtrwania określonym na około 6 godz. [2, 7, 8].

Nikotyna jest jednak najbardziej poznanym, farmakologicznie aktywnym składnikiem tytoniu. Poza wątrobą metabolizowana jest w nerkach i płucach. Może być absorbowana przez skórę, układ pokarmowy, oddechowy i wydalniczy. Jako niezdysononowana, słaba zasada rozpuszcza się w tłuszczach i łatwo migruje przez błony komórkowe. Jest rozprowadzana do wszystkich tkanek i płynów ustroju ludzkiego. Jej stężenie, poza płynami ustrojowymi może być oznaczane właściwie we wszystkich tkankach [9].

Wiergowski et al. [10] zwrócili uwagę, iż wybór materiału biologicznego do badań powinien być dokonany na podstawie założonego celu analizy. Ocenę narażenia na składowe dymu tytoniowego w ciągu ostatnich godzin można oprzeć na analizie osocza krwi lub śliny. Okres kilku dni jest możliwy przy badaniu stężeń w moczu. Po upływie kilku miesięcy od ekspozycji natomiast analiza powinna dotyczyć włosów lub paznokci.

W wielu badaniach potwierdzono silną korelację między stężeniem kotyniny w płynach ustrojowych a ilością nikotyny przyswajaną przez palaczy, a także utrzymywanie się stężenia kotyniny na tym samym poziomie w materiale biologicznym z jednoczesnym zmniejszaniem się stężenia nikotyny po okresie narażenia na dym tytoniowy [11, 12]. Dodatkowo komisja ekspertów powołana w ramach *Society for Research on Nicotine and To-*

*bacco* uznała pomiar stężenia kotyniny w surowicy lub moczu za najlepszą metodę w ocenie narażenia na środowiskowy dym tytoniowy [13].

Kyerematen et al. [14] opisali stężenie nikotyny i kotyniny u nałogowych palaczy i osób niepalących w surowicy krwi, ślinie i moczu. Dowiedli większych stężeń nikotyny w moczu w porównaniu ze stężeniami kotyniny, odpowiednio: 60 ng/ml vs 7 ng/ml u niepalących i 2890 ng/ml vs 2790 ng/ml u nałogowo palących tytoń. W surowicy krwi i ślinie natomiast wykazali większe stężenia kotyniny w porównaniu z nikotyną, odpowiednio: 8 ng/ml vs 2 ng/ml w surowicy i 9 ng/ml vs 2 ng/ml w ślinie niepalących oraz 148 ng/ml vs 35 ng/ml w surowicy i 243 ng/ml vs 3 ng/ml w ślinie osób nałogowo palących. W obu badanych grupach pacjentów stężenie kotyniny było większe względem nikotyny w surowicy krwi i ślinie. Kotynina jednak największe stężenie u osób palących osiągnęła w moczu:  $2272 \pm 532$  ng/ml.

Wiergowski et al. [10] zaobserwowali, że wśród aktywnych palaczy stężenie kotyniny było znacząco większe w moczu w stosunku do jej zawartości w surowicy krwi i ślinie.

Zależność tę z zastosowaniem innych metod analitycznych potwierdzają również badania Moniczewskiego et al. [15], którzy podali minimalne graniczne oznaczalności kotyniny w moczu od 5 do 50 ng/cm<sup>3</sup>, w ślinie i surowicy krwi porównywalnie: od 1 do 10 ng/cm<sup>3</sup>.

Mocz z uwagi na nieinwazyjne pobranie próbki wydaje się najbardziej uniwersalnym materiałem do badania, w którym stężenie głównego metabolitu nikotyny jest 5-6 razy większe niż w surowicy lub ślinie. Większe stężenia kotyniny w moczu pozwalają na zastosowanie selektywnych i, co należy podkreślić, znacznie prostszych i bardziej uniwersalnych metod analitycznych niż przy oznaczeniach tego samego metabolitu w innych

materiałach, np. we włosach. Wydalanie kotyniny z moczem zależy od sprawności funkcjonowania nerek i pH moczu [16]. Z kolei, jak podkreślają Wiergowski et al. [10], w aspekcie badań toksykologicznych nie bez znaczenia pozostaje możliwość zafałszowania próbki przed pobraniem przez jej rozcieńczenie lub zagęszczenie. Dlatego w celu prawidłowej interpretacji wyników pomiarów zaleca się oznaczenie i przeliczenie stężenia analitów względem zawartości kreatyniny w moczu [17].

Oznaczeń metabolitów nikotyny można dokonać wieloma metodami analitycznymi. Należą do nich metody immunologiczne (RIA, ELISA), wysoko sprawna chromatografia cieczowa (HPLC) oraz chromatografia gazowa (GC) z zastosowaniem różnych detektorów (ECD, FID, NPD, MS) [18]. Szybkość i możliwość bezpośrednich ozna-

czeń, bez długotrwałych procedur wstępnych, niewielka ilość materiału biologicznego potrzebnego do analizy, czułość na poziomie 96-98% i specyficzność metody w zakresie 98-100% spowodowała, że w badaniach własnych posłużono się chromatografią cieczową.

Mc Guire et al. [19] porównali stężenie kotyniny w ślinie i płynie szczeliny dziąsłowej nałogowych palaczy. Dowiedli istotnie większych stężeń kotyniny w płynie dziąsłowym w zakresie 206–8056 ng/ml w porównaniu ze stężeniami w ślinie 158–1054 ng/ml.

Paszkowski et al. [20] przedstawili natomiast różnice stężeń kotyniny w surowicy krwi i wczesnym mleku położnic u osób narażonych biernie na działanie dymu tytoniowego w porównaniu z nałogowymi palaczami. W surowicy i mleku kobiet niepalących zanotowano stężenia kotyniny rzędu 0-10 ng/ml, a u kobiet palących tytoń medianę 102 ng/ml, przy istotności statystycznej  $p = 0,00014$ .

Na podstawie badań własnych, zrealizowanych na podstawie analizy surowicy krwi, można sądzić, iż ten materiał biologiczny zachowuje trwałość badanych składowych dymu tytoniowego, szczególnie kotyniny. Bernert et al. [21] wykazali, że związki te są stabilne nawet w długo przechowywanym materiale biologicznym. Przechowując próbki surowicy krwi przez 6 tygodni w temp. 37°C i przez około 40 miesięcy w temp. -60°C, stwierdził, że stężenie kotyniny pozostaje niezmienione.

Analizując dostępne piśmiennictwo i przeprowadzone badania, trudno doszukać się badań opisujących stężenia metabolitów nikotyny w aspekcie ich wpływu na tkanki przyzębia. Dostępny materiał biologiczny do oceny narażenia na dym tytoniowy został powszechnie uznany, a nikotyna i jej metabolity za oznaczalne i specyficzne. Problem wpływu składowych dymu tytoniowego pozostaje jednak nadal aktualny i nie do końca wyjaśniony.

Nowak-Banasik et al. [22] wykazali, że w grupie nałogowych nikotynistów średnie stężenie kotyniny w surowicy krwi wynosiło 292,66 ng/ml. W grupie osób niepalących, lecz narażonych na palenie bierne stężenie kotyniny kształtowało się na poziomie 14 ng/ml, a u pacjentów w ogóle nieekspozowanych stężenie kotyniny w surowicy osiągało jedynie wartość 0,6 ng/ml.

Xu et al. [23] w swoich badaniach oceniających utratę kości wyrostka zębodołowego, określili stężenie kotyniny w osoczu krwi 116 badanych pacjentów w przebiegu zapalenia przyzębia palących

papierosy i wykazali korelację stężenia kotyniny w osoczu z liczbą wypalanych papierosów w ciągu dnia. Leow et al. [24] użyli kotyniny w osoczu jako biochemicznego markera nikotynizmu, z uwagi na okres półtrwania w osoczu określony na 30 godz. i 17 min. Analizując grupę 135 osób, wykazali istotny związek między liczbą wypalonych papierosów, stężeniem kotyniny w osoczu i stopniem zaawansowania zapalenia tkanek przyzębia.

Gonzalez et al. [25] także określili kotyninę, główny metabolit nikotyny, jako marker biochemiczny ilościowej metody oceny poziomu, statusu palenia tytoniu i korelacji stężenia kotyniny w osoczu z nasileniem zapalenia przyzębia. Badaniem objęli grupę 79 pacjentów w wieku 25-64 r.ż. i wykazali istotne statystyczne różnice średniego poziomu kotyniny, wyraźnie różniące grupę osób palących i niepalących papierosy. Nasilenie zmian destrukcyjnych było także dodatnio skorelowane ze stężeniem kotyniny w surowicy krwi. Osoby nałogowo palące tytoń charakteryzowały się większą liczbą zębów wykazujących utratę przyczepu łącznotkankowego (CAL  $p < 0,005$ ) i destrukcją kości wyrostka zębodołowego szczęki i żuchwy (BCH Bone Crest Height,  $p < 0,008$ ).

W badaniach własnych, zestawiając wybrane wskaźniki stanu przyzębia oraz parametry periodontologiczne z poziomem nikotyny, kotyniny i 3'-hydroksykotyniny wykazano, że w grupie osób nałogowo palących tytoń wszystkie wskaźniki kliniczne przyjęły wartości świadczące o zdecydowanie większej destrukcji tkanek przyzębia w porównaniu z pacjentami niepalącymi. Wykazano również największe stężenia kotyniny w surowicy krwi w porównaniu z nikotyną i 3'-hydroksykotyniną, co pozostaje zgodne z doniesieniami autorów innych badań i pozwala uznać kotyninę za najbardziej użyteczny marker ekspozycji na dym tytoniowy [2, 7, 8, 24]. Przedstawiając korelacje poszczególnych wskaźników i parametrów periodontologicznych z metabolitami nikotyny, wykazano ponadto istotne statystycznie dodatnie korelacje nikotyny z głębokością kieszonek przyzębnych. Istotne statystycznie dodatnie korelacje pomiędzy badanymi metabolitami nikotyny dowodzą natomiast ich powstawania w wyniku przemian biochemicznych prekursora obecnego w dymie tytoniowym – nikotyny. Minimalna interwencja antynikotynowa musi być elementem każdego postępu profilaktycznego u pacjentów z periodontopatiami.

## Piśmiennictwo

- [1] LAUTERBACH J.H., BAO M., JOZA P.J., RICKERT W.S.: Free-base nicotine in tobacco products. Part I. Determination of free-base nicotine in the particulate phase of mainstream cigarette smoke and the relevance of these findings to product design parameters. Regul. Toxicol. Pharmacol. 2010, 58, 45-63.



- [2] BENOWITZ N.L., POMERLEAU O.F., POMERLEAU C.S., JACOB P.: Nicotine metabolite ratio as a predictor of cigarette consumption. *Nic. Tobacco Res.* 2003, 5, 1-6.
- [3] ARMITAGE G.C.: Development of a classification system for periodontal diseases and conditions. *Ann Periodontol.* 1999, 4, 1-6.
- [4] LANGE D.E., PLAGMANN H.CHR., EENBOOM A., PROMMSBERGER A.: Klinische Bewertungsverfahren zur Objectivierung der Mundhygiene. *Dtsch Zahnärztl. Z.* 1977, 32, 44-47.
- [5] MÜHLEMANN H.R., SON S.: Gingival sulcus bleeding – a leading symptom in initial gingivitis. *Helv. Odont. Acta.* 1971, 15, 107.
- [6] RUDZIŃSKI R., BANACH J., SAFRANOW K., DEMBOWSKA E., DROŹDZIK A., MAZUREK-MOCHOL M.: Nikotynizm a wybrane parametry periodontologiczne w przewlekłym zapaleniu przyzębia. *Dent. Med. Probl.* 2011, 42, 180-188.
- [7] KYEREMATEN G.A., MORGAN M.L., CHATTPADHYAY B., DEBETHIZY J., VESELL E.S.: Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers and nonsmokers: Identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1990, 48, 641-651.
- [8] BENOWITZ N.L., JACOB P.: Effects of cigarette smoking and carbon monoxide on nicotine and cotinine metabolism. *Clin. Pharmacol. Ther.* 2000, 67, 653-659.
- [9] SOBCZAK A., WARDAS W., ZIELIŃSKA-DANCH W., SZOŁTYSEK-BOŁDYS I.: Biomarkery narażenia na dym tytoniowy. *Przegl. Lek.* 2005, 62, 1192-1196.
- [10] WIERGOWSKI M., NOWAK-BANASIK L., JANKOWSKI Z., MORKOWSKA A., SEIN ANAND J.: Determination of nicotine, cotinine and caffeine in standard and alternative biological material – usefulness in clinical and forensic toxicology. *Probl. Foren. Sci.* 2006, 66, 140-153.
- [11] EBBERT J.O., DALE L.C., NIRELLI L.M., SCHROEDER D.R., MOYER T.P., HURT R.D.: Cotinine as a biomarker of systemic nicotine exposure in spit tobacco users. *Addictiv. Behav.* 2004, 29, 349-353.
- [12] GHOSHEH O.A., BROWNE D., ROGERS T., DE LEON J., DWOSKIN L., CROOKS P.A.: A simple high performance liquid chromatographic method for the quantification of total cotinine, total 3'-hydroxycotinine and caffeine in the plasma of smokers. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2000, 23, 543-546.
- [13] SRNT (Society for Research on Nicotine and Tobacco), Subcommittee on biochemical verification. Biochemical verification of tobacco use and cessation. *Nicotine Tob. Res.* 2002, 4, 149-151.
- [14] KYEREMATEN G.A., MORGAN B.S., BALAKA M.S., DEBETHIZY D., VESELL E.: Disposition of nicotine and eight metabolites in smokers and nonsmokers: Identification in smokers of two metabolites that are longer lived than cotinine. *Clin. Pharm. Ther.* 1990, 48, 641-651.
- [15] MONICZEWSKI A.: Tobacco smoke exposure indicators. *Bromatol. Chem. Toksykol.* 2003, 36, 167-175.
- [16] BAIDOO E.E.K., CLENCH M.R., SMITH R.F., TETLER L.W.: Determination of nicotine and its metabolites in urine by solid-phase extraction and sample stacking capillary electrophoresis-mass spectrometry. *J. Chromatogr.* 2003, 796, 303-313.
- [17] DHAR P.: Measuring tobacco smoke exposure: quantifying nicotine/cotinine concentration in biological samples by colorimetry, chromatography and immunoassay methods, *J. Pharm. Biom. Ann.* 2004, 35, 155-168.
- [18] RUSTEMEIER K., DEMETRIOU D., SCHEPERS G., VONKER P.J.: High-performance liquid chromatographic determination of nicotine and its urinary metabolites via their 1,3-diethyl-2-thiobarbituric acid derivatives, *J. Chromat.* 1993, 613, 95-103.
- [19] MCGUIRE J.R., MCQUADE M.J., ROSSMANN J.A., GARNICK J.J., SUTHERLAND D.E., SCHEIDT M.J., VAN DYKE T.E.: Cotinine in saliva and gingival crevicular fluid of smokers with periodontal disease. *J. Periodontol.* 1989, 60, 176-181.
- [20] PASZKOWSKI T., WOJEWODA K.: Zawartość kotyniny w surowicy krwi oraz wczesnym mleku położnic palących papierosy. *Gin. Pol.* 2001, 72, 945-949.
- [21] BERNERT J.T., JACOB P., HOLIDAY D.B., BENOWITZ N.L., SOSNOFF C.S., DOIG M.V., FEYERABEND C., ALDOUS K.M., SHARIFI M., KELLOGG M.D., LANGMAN L.J.: Interlaboratory comparability of serum cotinine measurements at smoker and nonsmoker concentration levels: a round-robin study. *Nicotine Tob. Res.* 2009, 11, 1458-1466.
- [22] NOWAK-BANASIK L., SEIN ANAND J., CHODOROWSKI Z., WIERGOWSKI M., SOBICZEWSKI W.: Wpływ palenia tytoniu, ocenianego na podstawie oznaczenia kotoniny, na satysfakcję z życia chorych z chorobą wieńcową. *Przegl. Lek.* 2007, 64, 4-5.
- [23] XU L., LOOS B.G., CRAANDIJK J., RITSEMA E., HUFFELS R., VAN DER VELDEN U.: Teeth with periodontal bone loss, cigarette smoking and plasma cotinine levels. *J. Int. Acad. Periodontol.* 2002, 4, 39-43.
- [24] LEOW N.M., MOREL KOPP M.C., WOODWARD M., CHEN Q., TOFLER G.H., TAYLOR B.A.: The relationship between cotinine and periodontal disease. *Australas Ann. R. Coll. Surg. Dent.* 2006, 18, 55-62.
- [25] Gonzalez Y.M., Nardin D., Grossi S.G., Machtei E.E., Genco R.J.: Serum cotinine levels, smoking, and periodontal attachment loss. *J. Dent. Res.* 1996, 75, 796-802.

**Adres do korespondencji:**

Rafał Rudziński  
Zakład Periodontologii PUM  
al. Powstańców Wlkp. 72/18  
70-111 Szczecin  
tel.: 91 466 17 44/45, 601 70 75 78

Praca wpłynęła do Redakcji: 14.07.2011 r.  
Po recenzji: 17.07.2011 r.  
Zaakceptowano do druku: 22.08.2011 r.

Received: 14.07.2011  
Revised: 17.07.2011  
Accepted: 22.08.2011