

DAGMARA PIESIAK-PAŃCZYSZYN, AGNIESZKA CZAJCZYŃSKA-WASZKIEWICZ,
URSZULA KACZMAREK

Analiza porównawcza ultrastrukturalnego obrazu i składu chemicznego wczesnej zmiany próchnicowej i zdrowych tkanek twardych zębów

Comparative Ultrastructure Analysis of Image and Chemical Components of Early Caries Lesion and Sound Hard Tissue of the Teeth

Katedra i Zakład Stomatologii Zachowawczej i Dziecięcej AM

Streszczenie

Wprowadzenie. Wczesna zmiana próchnicowa jest jedynym odwracalnym etapem procesu próchnicowego. Klinicznie występuje w postaci białej lub brunatnej plamy (*macula alba/fusca*) dostrzegalnej na powierzchni zęba jako niewielkie, nieprzeźierne, mętne pole. Powierzchnia zmiany nie wykazuje utraty tkanki, jest twarda i gładka. Zastosowanie nowoczesnych metod diagnostycznych, tj. mikroskopu SEM oraz sondy mikroradiograficznej EDS umożliwia bardzo czułą ocenę nawet najmniejszych zmian występujących w strukturze szkliwa spowodowanych różnicami w jego składzie chemicznym.

Cel pracy. Określenie różnic strukturalnych występujących między zdrowym szkliwem a początkową zmianą próchnicową oraz wykonanie analizy chemicznej różnicowej dla obu badanych tkanek.

Materiał i metody. Sześć zębów przedtrzonowych usuniętych z powodów ortodontycznych. Na powierzchni trzech z nich stwierdzono w ocenie wizualnej wczesne zmiany próchnicowe. Pozostałe trzy zęby nie wykazywały żadnych zmian patologicznych i zostały określone jako zdrowe. Badanie przeprowadzono za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) – Joel JSM 5800 LV przy powiększeniu 90-krotnym, 220-krotnym, 5000-krotnym oraz 15 000-krotnym, a następnie wykonano analizę mikroradiograficzną określającą zawartość pierwiastków chemicznych, takich jak: Ca, Mg, Na, P, Cl, używając aparatu EDS (Oxford JSIS 300).

Wyniki. Uzyskane wyniki potwierdzają zależność między strukturą tkanki badanej a jej składem chemicznym. Zastosowanie różnych powiększeń, od kilkuset do kilkunastotysięcznokrotnych, umożliwiło analizę ultrastrukturalną na poziomie pojedynczych kryształów szkliwa. Różnice w składzie chemicznym określane za pomocą EDS były bezpośrednio związane ze stanem badanej tkanki.

Wnioski. Połączenie tych dwóch metod może w przyszłości przyczynić się do dużego postępu w diagnostyce, monitorowaniu, leczeniu i zapobieganiu chorobom tkanek twardych zębów (**Dent. Med. Probl. 2005, 42, 3, 443–448**).

Słowa kluczowe: wczesna zmiana próchnicowa, SEM, analiza mikroradiograficzna.

Abstract

Background. The early caries lesion is the only one reversible stage of the carietic process. Clinically is presented as white or brown spot (*macula alba/fusca*) which can be observed as small, opaque lesion. The surface of the lesion does not reveal loss of tissue, it is smooth and hard. Using modern diagnostic methods as SEM microscopy and microradiography analysis enables very sensitive assessment even the smallest changes on the ultrastructural level caused by the differences in the chemical compounds.

Objectives. The evaluation of structural differences between sound enamel and early caries lesion using SEM microscopy and microradiography analysis (EDS).

Material and Methods. The examination comprised 6 premolar teeth extracted for orthodontic reasons: half of them revealed early caries lesion, the rest were sound. The study was obtained using SEM microscopy (Joel JSM 5800 LV) in $\times 90$, $\times 220$, $\times 5000$ and $\times 15\,000$ magnification. The data for microradiography analysis concerning the level of Ca, Mg, Na, P, Cl were obtained using EDS (Oxford JSIS 300).

Results. The collected data present indicate significant relation between the structure and chemical compounds of

examined tissue. Multiple magnifications enable precise analysis on the single cristal level. The chemical compounds were directly connected with the stage of carietic process.

Conclusions. Both of those methods can be very usefull for dentist in diagnostic, monitoring, treatment and profilaxis of caries and potentially can be used to develop diagnostic and monitoring devices for caries *in vivo* (**Dent. Med. Probl.** 2005, 42, 3, 443–448).

Key words: early caries lesion, SEM, microradiography analysis.

Wczesna zmiana próchnicowa jest jedynym odwracalnym etapem procesu próchnicowego. Klinicznie występuje w postaci białej (*macula alba*) lub brunatnej plamy (*macula fusca*) dostrzegalnej na powierzchni zęba jako niewielkie, nieprzeziernie, mętne pole. Powierzchnia zmiany nie wykazuje utraty tkanki, jest twarda i gładka [1–6]. Jej progresja prowadzi do powstania nieodwracalnych zmian z dalszymi konsekwencjami dla miazgi i tkanek okołowierzchołkowych. Już kilkadziesiąt lat temu makroskopowe obserwacje przekrojów zmiany pozwoliły wyróżnić dwie, strukturalnie różne warstwy: nieznacznie uszkodzoną, silnie zmineralizowaną warstwę powierzchniową i zde-mineralizowaną warstwę podpowierzchniową. Użycie w 1956 r. przez Darlinga, a w latach 60. przez Silverstona, świetlnego polaryzacyjnego mikroskopu i zastosowanie większych powiększeń dało możliwość opisanie trzech warstw: nieuszkodzonej warstwy powierzchniowej, znacznie zde-mineralizowanej warstwy środkowej i nieznacznie zmienionej warstwy wewnętrznej [1, 3, 7–12]. Prawdziwy przełom nastąpił jednak pod koniec lat 60., kiedy to wykorzystano elektronowy mikroskop skaningowy (SEM), dając początek bardzo wnikliwej analizie szkliwa na poziomie ultrastrukturalnym.

Elektronowy mikroskop skaningowy jest urządzeniem, w którym powiększony obraz badanego obszaru preparatu jest uzyskiwany za pomocą wiązki elektronów przemieszczanych po badanej powierzchni metodą skanowania (linia po linii), tworząc tzw. ramkę obrazową. Podstawową zaletą SEM jest możliwość bezpośredniej obserwacji powierzchni próbki o bardzo zróżnicowanej topografii oraz możliwość połączenia z komputerowym systemem przetwarzania obrazu, co umożliwia przedstawienie wyników także w postaci ilościowej [13]. Opierając się na takich właśnie badaniach stwierdzono wówczas istnienie aż czterech warstw wczesnej zmiany próchnicowej, tj. powierzchniowej, centralnej, ciemnej i przezroczystej (ryc. 1) [1, 3, 7–10]. Obecna diagnostyka *caries incipiens* w warunkach *in vitro* często opiera się na zastosowaniu mikroskopu SEM, ponieważ umożliwia bardzo czułą ocenę nawet najmniejszych różnic w strukturze, spowodowanych zmianą w składzie chemicznym szkliwa, nieuchwytnych w powszechnie stosowanych badaniach klinicznych.

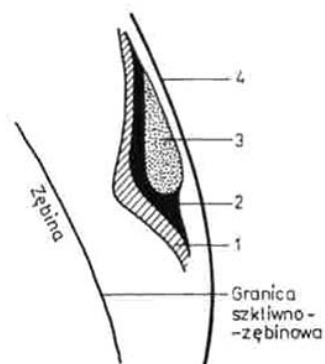
Celem pracy jest określenie różnic strukturalnych występujących między zdrowym szkliwem a początkową zmianą próchnicową przy zastosowaniu SEM oraz wykonanie analizy chemicznej różnicowej dla obu tych tkanek na drodze badania mikroradiograficznego (EDS).

Materiały i metody

Materiałem badawczym było 6 zębów przedtrzonowych usuniętych z powodów ortodontycznych u pacjentów w wieku 20–30 lat. Na powierzchni trzech z nich stwierdzono w wizualnej ocenie nieuzbrojonym okiem oraz z użyciem 3-krotnego powiększenia wczesne zmiany próchnicowe w postaci białego lub ciemno brązowego zmętnienia (*macula alba/macula fusca*) (ryc. 2a). Pozostałe trzy zęby nie wykazywały żadnych zmian patologicznych i zostały określone jako zdrowe (ryc. 3a). Badanie przeprowadzono za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) – Joel JSM 5800 LV. Przygotowane próbki badano w powiększeniu 90-krotnym, 220-krotnym, 5000-krotnym oraz 15 000-krotnym, a następnie przeprowadzono badanie mikroradiograficzne określające zawartość pierwiastków chemicznych, takich jak: Ca, Mg, Na, P, Cl, używając aparatu EDS (Oxford JSIS 300). Analiza została przeprowadzona w dwóch punktach powierzchni badanych zębów: w punkcie A, znajdującym się na zdrowym szkliwie i w punkcie B, zdefiniowanym jako miejsce zmienione próchnicowo. Uzyskane wyniki w postaci wartości średnich zamieszczono w tabeli 1.

Wyniki

Wczesna zmiana próchnicowa obserwowana w mikroskopie skaningowym wykazuje charakterystyczną budowę warstwową i składa się z czterech, wcześniej wymienionych warstw: powierzchniowej, centralnej, ciemnej i przezroczystej. Warstwa powierzchniowa o głębokości 20–50 µm pokrywa powierzchnię wczesnej zmiany próchnicowej, jest wysoko zmineralizowana i strukturą przypomina zdrowe szkliwo. Objętość porów w tej warstwie wynosi 1% i taka sama jest utrata substancji mineralnych. Warstwa centralna (*body of the lesion*) stanowi największą część zmiany,



Ryc. 1. Schemat wczesnej zmiany próchnicowej
1 – warstwa przezroczysta; 2 – warstwa ciemna;
3 – warstwa centralna *body of the lesion*; 4 – warstwa powierzchniowa

Fig. 1. Scheme of early caries lesion
1 – translucent zone; 2 – dark zone; 3 – central zone;
4 – superficial zone

w której objętość porów waha się od 5% obwodo-wo do 25% w części środkowej. Warstwa ciemna charakteryzuje się występowaniem różnej wielkości porów (2–4%) i ubytkiem substancji mineralnych sięgających 2–5%. Ostatnia warstwa, licząc od strony powierzchni zmiany, to warstwa przezroczysta. Nie występuje we wszystkich tworzących się wczesnych zmianach próchnicowych, jest pierwszą widoczną oznaką procesu patologicznego, graniczy ze zdrowym szkliwem i wykazuje utratę substancji mineralnych w granicach około 1–2% i wzrost porowatości o około 1% [1–7, 10, 14, 15].

Zdjęcie makroskopowe, np. zęba 15 (ryc. 2a), przedstawia powierzchnię styczną bliższą z widoczną klinicznie początkową zmianą próchnicową w postaci brunatnej plamy. Na powierzchni zmiany widać zmętnienie i utratę przejrzystości, ale jest gładka, błyszcząca, bez widocznej utraty ciągłości. Obraz tej samej zmiany, oglądany w powiększeniu 90-krotnym (ryc. 2b), ukazuje niekniętą warstwę powierzchniową pokrywającą podpowierzchniowe uszkodzenie ostro odgraniczone od zdrowego szkliwa, czyli wcześniej już wspomnianą warstwę centralną (*body of the lesion*). Uzyskane obrazy są zgodne z wynikami innych prac [1, 6, 11, 12]. Ryc. 2c, 2d, 2e przedstawiają tę samą zmianę na powierzchni zęba 15 w większych powiększeniach – 220-krotnym, 5000-krotnym i 15 000-krotnym. Duże powiększenia ujawniają zmiany strukturalne oraz umożliwiają ocenę stopnia uszkodzenia pryzmatów szkliwa. Analizując otrzymane zdjęcia, można zauważyć obecność charakterystycznych dla procesu próchnicowego zmian, polegających na częściowym, dość nieregularnym rozpuszczeniu pryzma-

tów, zmniejszeniu ich szerokości i grubości oraz wzroście objętości wolnych przestrzeni międzykryształicznych oddzielających ściśle dotychczas upakowane kryształy. Zmiana wielkości kryształów jest dość znaczna, gdyż opierając się na danych z literatury, ich średnica po demineralizacji waha się w granicach 10–30 nm, przy normalnych rozmiarach zdrowego apatytu – 35–40 nm [11, 12, 14]. Destrukcja pryzmatów szkliwnych może przebiegać w trzech kierunkach: z uszkodzeniem wewnątrz pryzmatów – typ 1, z poszerzeniem osłonek pryzmatycznych – typ 2 i z całkowitą utratą struktury szkliwa – typ 3 [1, 10–12]. Najczęściej spotyka się pierwszy typ uszkodzenia szkliwa, co potwierdzają także badania własne. Obserwowane pryzmaty wykazują uszkodzenia rdzeni i poszerzenia osłonek. Nadaje im to swoisty obraz określany jako arkadowy [1, 15] (ryc. 2c). Należy jednak zwrócić uwagę, że opisane trzy typy uszkodzeń mogą występować równocześnie i to na niewielkim obszarze. Zasadą jest, że im silniejszy czynnik uszkadzający i dłuższy czas jego działania, tym większe uszkodzenia w strukturze tkanki. Ryc. 2e przedstawia masywne zniszczenie szkliwa w postaci całkowicie zatartej budowy, uszkodzenia zarówno wewnątrz, jak i przerwanie ciągłości osłonek pryzmatów. Jednak należy pamiętać, że tak duże zniszczenia, powodujące zatarcie nawet szkieletu struktury tkanki, występują dość rzadko i obejmują bardzo ograniczoną powierzchnię. Podobne zmiany opisano także w innych pracach [1, 3, 4, 6].

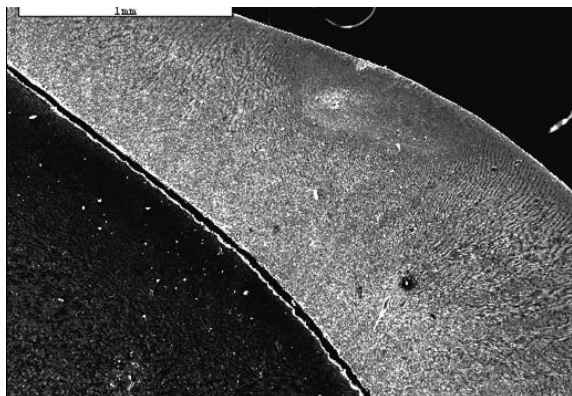
W celach porównawczych zostały również wykonane badania powierzchni zdrowego szkliwa – przykładowo powierzchnia styczna bliższa zęba 25, widoczna na zdjęciu makroskopowym (ryc. 3a). Obrazy w większych powiększeniach – 90-krotnym (ryc. 3b), 220-krotnym (ryc. 3c), 5000-krotnym (ryc. 3d) oraz 15 000-krotnym (ryc. 3e) uwiadcniają uporządkowaną strukturę zdrowej tkanki, złożonej ze ściśle upakowanych kryształów poprzedzielanych przestrzeniami międzypryzmatycznymi o niewielkim świetle. W strukturze pojedynczych kryształów nie zauważono elementów utraty ciągłości otoczki i zmiany struktury rdzeni. Kształty i rozmiary nie odbiegają od przyjętej normy, są powtarzalne i regularne. Objętość porów nie przekracza 0,1%, tak jak to opisano w piśmiennictwie [3, 8, 10–14]. Wykorzystując największe zastosowane powiększenie (15 000-krotne), wykonano również badanie mikroradiograficzne, którego wyniki umieszczono w tabeli 1.

Pomiary dla każdego zęba wykonano w punkcie A na zdrowym szkliwie lub w punkcie B – w zmianie próchnicowej. Podstawowym składnikiem szkliwa pod względem składu chemicznego



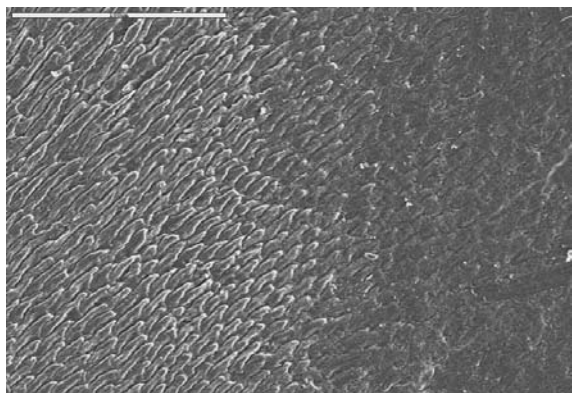
Ryc. 2a. Ząb 15 – początkowa zmiana próchnicowa – zdjęcie makroskopowe

Fig. 2a. Tooth 15 – early caries lesion – macroscopic view



Ryc. 2b. Ząb 15 – początkowa zmiana próchnicowa – powiększenie 90×

Fig. 2b. Tooth 15 – early caries lesion – ×90 magnification



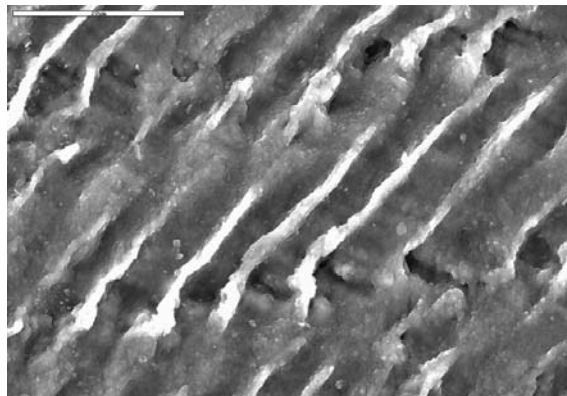
Ryc. 2c. Ząb 15 – początkowa zmiana próchnicowa – powiększenie 220×

Fig. 2c. Tooth 15 – early caries lesion – ×220 magnification

jest hydroksyapatyt o budowie $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Czysta postać składa się w 57% z fosforu, 40% wapnia i 2% jonów hydroksylowych, ale najczęściej zawiera dodatkowe pierwiastki mające wpływ na jego odporność na działanie czynników kariogennych. Dodatek mikroelementów, tj. fluor, bor, bar, molibden, stront i wanad, wzmacniają szkliwo i zmniejszają jego rozpuszczalność w kwasach, obecność natomiast węgla, litu, cynku, magnezu osłabia tkanki twarde i zwiększa podatność na próchnicę. Dystrybucja związków nieorganicznych w szkliwie jest dość nieregularna i poziom poszczególnych składników mineralnych waha się w dość szerokich granicach. Jest

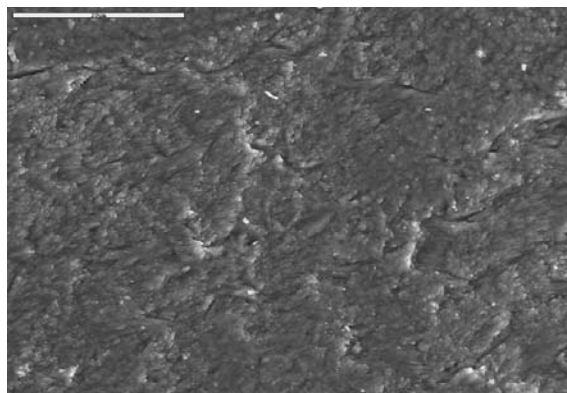
on w dużym stopniu uzależniony od rodzaju zęba, stopnia jego dojrzałości, stanu tkanek twarzych, wieku pacjenta, diety i poziomu fluoru w pożywieniu.

W przeprowadzonych badaniach wykonano pomiary pięciu pierwiastków: Ca, P, Mg, Cl i F. Jednymi z najważniejszych wyznaczników che-



Ryc. 2d. Ząb 15 – początkowa zmiana próchnicowa – powiększenie 5000×

Fig. 2d. Tooth 15 – early caries lesion – ×5000 magnification



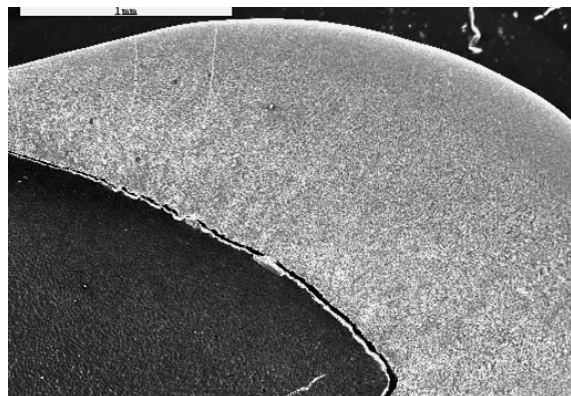
Ryc. 2e. Ząb 15 – początkowa zmiana próchnicowa – powiększenie 15 000×

Fig. 2e. Tooth 15 – early caries lesion – ×15 000 magnification

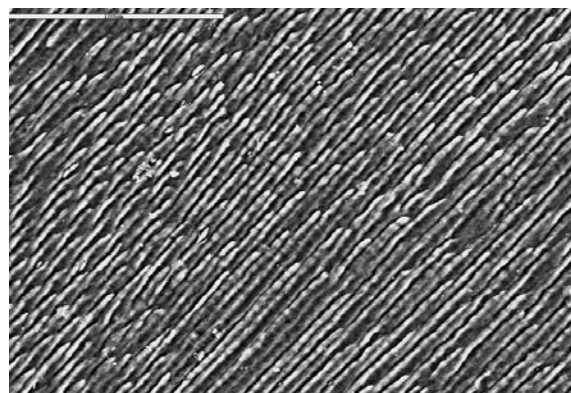
micznych szkliwa są wapń i fosfor. Dla obu tych składników ich koncentracja w zdrowej tkance szkliwnej zmniejsza się od powierzchni szkliwa w kierunku zębiny – dla wapnia waha się w granicach 36,5–40,0% wagowych, a dla fosforu – 17,25–18,25% [14, 16]. Proces próchnicowy powoduje rozpuszczanie pryzmatów i utratę substancji mineralnych, a zatem spadek poziomu wapnia i fosforu. Dochodzi także do zmiany wzajemnych proporcji obu tych pierwiastków, co powoduje zmianę wartości stosunku Ca/P [5]. Dla zdrowego szkliwa waha się w granicach 1,8–2,3, dla tkanki próchnicowej natomiast jego wartość wyraźnie spada [14, 16]. Uzyskane w badaniach



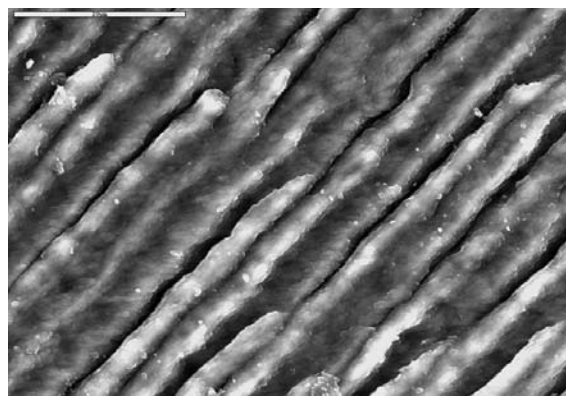
Ryc. 3a. Ząb 25 – zdrowy – zdjęcie makroskopowe
Fig. 3a. Tooth 25 – sound – macroscopic view



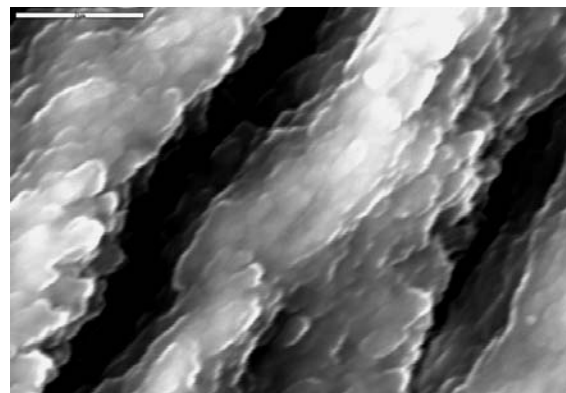
Ryc. 3b. Ząb 25 – zdrowy – powiększenie 90×
Fig. 3b. Tooth 25 – sound – ×90 magnification



Ryc. 3c. Ząb 25 – zdrowy – powiększenie 220×
Fig. 3c. Tooth 25 – sound – ×220 magnification



Ryc. 3d. Ząb 25 – zdrowy – powiększenie 5000×
Fig. 3d. Tooth 25 – sound – ×5000 magnification



Ryc. 3e. Ząb 25 – zdrowy – powiększenie 15000×
Fig. 3e. Tooth 25 – sound – ×15000 magnification

Tabela 1. Skład chemiczny szkliwa: A – szkliwo zdrowe, B – zmiana próchnicowa

Table 1. Chemical components of the enamel: A – sound enamel, B – early caries lesion

	Szkliwo (Enamel)			
	A – zdrowe (sound)		B – próchnica (caries)	
	% atomowe (atomic)	% wagowe (weight)	% atomowe (atomic)	% wagowe (weight)
Ca	18,89	32,68	10,81	20,96
P	13,06	17,48	9,00	13,48
Mg	0,41	0,40	0,44	0,46
F	0,50	0,43	0,18	0,16
Cl	0,36	0,54	0,34	0,60

wyniki zamieszczono w tabeli 1. Średni poziom wapnia w zdrowym szkliwie wynosił 32,68% wagowych, w zmianie próchnicowej natomiast spadł do 20,96% wagowych. W przypadku fosforu wyniki były następujące: zdrowe szkliwo 17,48% wagowych, zmiana próchnicowa 13,48%. Stosunek Ca/P dla tkanki zdrowej wy-

niósł 1,9, dla tkanki próchnicowej natomiast 1,5. Wykonane pomiary dotyczyły również innych pierwiastków (Mg, Cl i F), jednak trudno na ich podstawie wysuwać jakiegokolwiek wnioski. Według innych autorów [16] ich poziom w szkliwie waha się w bardzo szerokich granicach i wszelkie uśrednienia tych wartości mogą być nieprawidłowe. Z pracy Robinsona et al. [16] wynika, że na przykład poziom magnezu w zdrowej tkance może wahać się od 750 do 3000 ppm, a chloru – od 1000 do 6500 ppm. Nie można zatem ich traktować jako jednoznacznych wskaźników aktualnego stanu badanej tkanki.

Omówienie

Uzyskane badania wskazują na wyraźną zależność struktury i składu chemicznego tkanki od jej aktualnego stanu. Zarówno badanie w SEM, umożliwiające wizualizację tkanek twardych zęba, jak i za pomocą EDS, obrazujące skład chemiczny w poszczególnych punktach pomiaru, stanowią istotne źródło informacji odnośnie do zmian zachodzących w strukturze i składzie wczesnej zmiany próchnicowej. Dzięki możliwościom technicznym mogą one być obserwowane na wielu poziomach,

od kilkusetkrotnego powiększenia do nawet kilkunastotysięcznego, umożliwiając wnikliwą analizę nawet pojedynczych kryształów szkliwa. Wszystko to może przyczynić się do dużego postępu w diagnostyce, monitorowaniu, leczeniu i zapobieganiu chorobom tkanek twardych zębów. Dużym ograniczeniem, ze względu na rozmiary, jest używanie tych badań tylko w warunkach *in vitro*. Istnieje jednak prawdopodobieństwo, że w przyszłości, dzięki zminiaturyzowaniu opisanych systemów, powstaną możliwości ich powszechnego zastosowania także w warunkach klinicznych.

Piśmiennictwo

- [1] MATTHEWS-BRZOZOWSKA T.: Wczesne zmiany próchnicowe w badaniu profilometrycznym i mikrostrukturalnym. Wydawnictwo Panoptikon, Poznań 1996, rozprawa habilitacyjna.
- [2] NAPIONTEK-KUBANEK H.: Ocena ultrastrukturalna plam próchnicowych SEM po stosowaniu wybranych środków profilaktycznych. Czas. Stomat. 1994, 47, 737–742.
- [3] PIĄTOWSKA D.: Próchnica szkliwa – rozdział 5. In: Zarys kariologii. Eds.: Minakowski J. Med. Tour. Press International Wydawnictwo Medyczne, Warszawa 2002, 49–64.
- [4] FRANK R. M.: Structural events in the caries process in enamel, cementum and dentin. Dent. Res. 1990, 69 (Spec No), 559–566, 634–636.
- [5] ARENDS J., CHRISTOFFERSEN J.: The nature of early caries lesions in enamel. J. Dent. Res. 1986, 65, 2–11.
- [6] MÖLLER H., SCHRÖDER U.: Early natural subsurface caries. Caries Res. 1986, 20, 97–102.
- [7] ARENDS J., JONGEBLOED W., OGAAR B., ROLLA G.: SEM and microradiographic investigation of initial enamel caries. Scand J. Dent. Res. 1987, 95, 193–201.
- [8] INGRAM G. S., SILVERSTONE L. M.: A chemical and histological study of artificial caries in human dental enamel *in vitro*. Caries Res. 1994, 15, 393–398.
- [9] MORTIMER K. V., TRANTER T. C.: A scanning electron microscope study of carious enamel. Caries Res. 1971, 5, 240–263.
- [10] SILVERSTONE L. M.: The surface zone in caries and in caries-like lesions produced *in vitro*. Br. Dent. J. 1968, 125, 145–157.
- [11] HICKS M. J., SILVERSTONE L. M.: Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a polarized light microscopic study. Caries Res. 1984, 18, 315–326.
- [12] HICKS M. J., SILVERSTONE L. M.: Acid-etching of caries-like lesion of enamel; a scanning microscopic study. Caries Res. 1984, 18, 327–335.
- [13] DUDZIŃSKI W.: Wybrane metody badań struktury materiałów metalicznych – cz. 2. Mikroskopia elektronowa. In: Materiały konstrukcyjne w budowie maszyn – ćwiczenia laboratoryjne. Eds.: Dudziński W. Oficyna Wydawnicza Politechniki Wrocławskiej, Wrocław 1994, 116–137.
- [14] ROBINSON C., KIRKHAM J., BROOKES S. J., SHORE R.: Chemistry of mature enamel – chapter 8. In: Dental enamel – formation to destruction. Eds.: Robinson C., Kirkham J. CRC Press 1995, 167–188.
- [15] MATTHEWS-BRZOZOWSKA T., SURDACKA A.: Ultrastrukturalny obraz szkliwa w próchnicy początkowej. Czas. Stomat. 1990, 43, 447–452.
- [16] MATTHEWS-BRZOZOWSKA T., SURDACKA A., KOBYLAŃSKA M., JÓZWIĄK K., STACHECKI B.: Remineralizacja sztucznie wywołanych uszkodzeń szkliwa w warunkach *in vitro* i *in vivo*. Czas. Stomat. 1991, 44, 251–257.

Adres do korespondencji:

Dagmara Piesiak-Pańczyszyn
ul. Kuźnicza 43/45
50-138 Wrocław
tel.: +4871 784 03 62
e-mail: dagmarapiesiak@poczta.onet.pl

Praca wpłynęła do Redakcji: 16.05.2005 r.
Po recenzji: 15.06.2005 r.
Zaakceptowano do druku: 17.06.2005 r.

Received: 16.05.2005
Revised: 15.06.2005
Accepted: 17.06.2005