

Działanie oleju z zielonego pieprzu (*Piper nigrum* L.) na grzyby drożdżopodobne wyizolowane z jamy ustnej

The activity of green pepper oil (*Piper nigrum* L.) to yeastlike fungi isolated from oral cavity

¹Emerytowany profesor Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

²Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich, Poznań

Dyrektor Naukowy Instytutu: prof. dr hab. n. techn. Ryszard Kozłowski

SUMMARY

Introduction. Black pepper (*Piper nigrum* L.) is one of the oldest spice of the world, and popularly known as the “king of all spices”. The plant is a member of family Piperaceae. *Piper nigrum* fruits are used to produce green pepper. Plant is very important for its medical value. Black pepper is used to treat indigestion, asthma, cough, diarrhea, rheumatism, muscular and stomach aches. It has been described as antispasmodic, diuretic antipyretic, anti-inflammatory and antioxidative. Plant contains among others: limonene, β -caryophyllene, α -phellandrene, sabinene, myrcene, linalool, α - i β -pinene, α -humulene, p-cymene and piperidine. *Piper nigrum* posses antibacterial, antifungal and insecticidal properties.

Aim. The aim of the study was to determine the susceptibility yeastlike fungi to green pepper oil.

Material and methods. The strains of yeastlike fungi were isolated from oral cavity from 15 patients with candidosis of oral cavity. The susceptibility of 14 strains of *Candida* and ones on each strain from *Rhodotorula* and *Saccharomyces* genus and 5 reference strains were tested. The activity of green pepper oil (Sri Lanka) was determined fold serially dilution in Sabouraud's agar. The final concentrations of the pepper's oil were: 1.25, 2.5, 5.0, 10.0 and 20.0 mg/ml. The inoculum containing 10^5 CFU/spot was seeded with Steers replicator upon the surface of agar with or without oil (strains growth control). The plates were incubated in aerobic conditions for 24 hrs at 37°C. The lowest concentration of oil that inhibited visible growth tested strains were recorded as the MIC.

Results. The results showed, that the most susceptible to oil were the strains from the genus of *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa* and *S. cerevisiae*. The growth of the strains were inhibited by concentrations of < 1.25 mg/ml. The least sensitive were the strains of yeastlike fungi from genus *C. albicans* (MIC < 1.25-2.5 mg/ml) and *C. glabrata* (MIC 1.25-5.0 mg/ml). The strains of *C. kefyr*, *C. krusei* and *C. tropicalis* were the lowest sensitive (MIC \geq 20.0 mg/ml).

Conclusions. The green pepper oil showed good activity against tested yeastlike fungal strains. The most susceptible to oil were strains from genus of *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa* and *S. cerevisiae* (MIC < 1.25 mg/ml). The strains of *C. kefyr*, *C. krusei* and *C. tropicalis* were the lowest sensitive (MIC \geq 20.0 mg/ml).

Keywords: yeastlike fungi, antifungal activity, green pepper oil, oral cavity

STRESZCZENIE

Wstęp. Pieprz czarny (*Piper nigrum* L.) jest jedną z najstarszych przypraw na świecie, uznawany za „króla wszystkich przypraw”. Roślina należy do rodziny Piperaceae. Z owoców czarnego pieprzu otrzymuje się zielony pieprz. Wykazuje on bardzo korzystne właściwości lecznicze. Czarny pieprz wykorzystywany jest do leczenia niestrawności, astmy, biegunki, reumatyzmu, bólów mięśni i żołądka. Opisano też jego właściwości przeciwskurczowe, diuretyczne, przeciwgorączkowe, przeciwzapalne i przeciwutleniające. Roślina zawiera m.in. limonen, β -kariofilen, α -felandren, sabinen, myrcen, linalol, α - i β -pinen, α -humulen, p-cymen i piperdyinę. Pieprz czarny wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze i insektobójcze.

Cel pracy. Celem badań było oznaczenie wrażliwości grzybów drożdżopodobnych na olej z zielonego pieprzu.

Material i metody. Szczepy grzybów drożdżopodobnych wyizolowano od 15 pacjentów z kandydozą jamy ustnej. Zbadano wrażliwość 14 szczepów z rodzaju *Candida* i po 1 szczepie z gatunku *Rhodotorula mucilaginosa* i *Saccharomyces cerevisiae* oraz 5 szczepów wzorcowych. Aktywność oleju z zielonego pieprzu (Sri Lanka) oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Sabourauda. Końcowe stężenia wynosiły: 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 i 20,0 mg/ml. Inokulum zawierające 10^5 CFU/kroplę przenoszono aparatem Steersa na powierzchnię agaru z odpowiednim stężeniem oleju lub bez jego dodatku (kontrola wzrostu szczepów). Posiewy inkubowano w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24 godz. Najmniejsze stężenie oleju hamujące wzrost zostało uznane za MIC.

Wyniki. Wyniki badań wskazują, że najbardziej wrażliwe na olej były szczepy grzybów z gatunku *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa* i *S. cerevisiae*. Wzrost tych szczepów był hamowany w stężeniu wynoszącym $< 1,25$ mg/ml. Mniej wrażliwe były szczepy grzybów drożdżopodobnych z gatunku *C. albicans* (MIC $< 1,25$ - $2,5$ mg/ml) i *C. glabrata* (MIC $1,25$ - $5,0$ mg/ml). Szczepy *C. kefyr*, *C. krusei* i *C. tropicalis* okazały się najmniej wrażliwe (MIC $\geq 20,0$ mg/ml).

Wnioski. Olej z zielonego pieprzu wykazał dużą aktywność wobec szczepów grzybów drożdżopodobnych. Najbardziej wrażliwe były szczepy z gatunku *Candida guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa* i *S. cerevisiae* (MIC $< 1,25$ mg/ml). Najniższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunku *C. kefyr*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (MIC $\geq 20,0$ mg/ml).

Słowa kluczowe: grzyby drożdżopodobne, działanie przeciwgrzybicze, olej z zielonego pieprzu, jama ustna

Wstęp

Od wielu lat poszukuje się roślin, których wyciągi, olejki eteryczne, oleje czy też poszczególne substancje czynne mogłyby być wykorzystane jako przyprawy albo środki konserwujące. Takie właściwości często wykazują występujące w wielu ziołach leczniczych olejki eteryczne i występujące w nich związki.

Czarny pieprz (*Piper nigrum* L.) uważany jest za jedną z najstarszych przypraw, znanych na całym świecie. Nazywany jest też „królem wszystkich przypraw” (1-3). Należy do rodziny pieprzowatych (*Piperaceae*). Jest to krzew pnący, który pochodzi z Indii. Był znany w starożytnej Grecji i Rzymie, gdzie stosowano go w zaburzeniach żołądkowych. Teofrast z Erezos (370-287 p.n.e.) opisał w swoim dziele leczenie zatruc za pomocą pieprzu. Marco Polo (1254-1323), kupiec wenecki i podróżnik, w swojej publikacji pt. „Opisanie świata” zamieścił wspomnienia o zwiedzaniu dużych plantacji pieprzu, a także wskazał na jego różne właściwości lecznicze. Natomiast w Chinach *Piper nigrum* był od wieków znany i używany jako lek przeciwmalaryczny i przeciwbiegunkowy. Vasco da Gama przywiózł owoce pieprzu do Portugalii ok. 1498 roku. Od tej pory kraj ten był głównym eksporterem pieprzu aż do XIX wieku. *Piper nigrum* został też rozpowszechniony jako przyprawa w południowej Azji. Obecnie, poza Indiami, hodowany jest w wielu krajach, w tym w Indonezji, Tajlandii, Wietnamie, Sri Lance, Chinach, Meksyku, Brazylii, Indonezji i Malezji. Roślina osiąga wysokość 6-15 m. Wytwarza sercowo-jajowate, ostro zakończone liście, białozielone kwiaty zebrane w kłosa oraz owoce o średnicy ok. 5 mm barwy zielonej, które podczas dojrzewania stają się czerwone. Pieprz czarny jest otrzymywany z owoców zielonych. Natomiast pieprz biały uzyskuje się z owoców już dojrzałych poddanych fermentacji. Owoce te mają charakterystyczny ostry zapach i żeby nie utraciły aromatu, muszą być przechowywane w szczelnie zamkniętych pojemnikach. Zależnie od regionu i kraju pochodzenia pieprz ma różne nazwy. Różnice dotyczą też wytwarzanych związków chemicznych i ich ilości. Najbardziej ceniony na świecie jest

pieprz hodowany w południowo-zachodnich Indiach, z Wybrzeża Malabar. Jest on stosowany jako przyprawa do zup, mięsa duszonego, serów, ryżu, sałatek, sosów, kanapek oraz w piekarnictwie (dodatek do pierników, ciasteczek korzennych i ciast owocowych), a także w przemyśle spożywczym (jako środek konserwujący) i perfumeryjnym.

Pieprz czarny wykazuje różne właściwości lecznicze i stosowany jest w przypadkach zaburzeń żołądkowych, astmy, kaszlu, zapalenia gardła, chorób serca, zapalenia dróg moczowych oraz jako środek zmniejszający ból zębów, żołądka i mięśni (4-8). Ma właściwości przeciwwymiotne i przeciwbiegunkowe, zapobiega nudnościom, działa przeciwreumatycznie, przeciwgorączkowo oraz zwiększa wydzielanie kwasu żołądkowego, enzymów trzustkowych i diurezę (2, 9-17). Ponadto badania wskazują na aktywność przeciwtleniającą (1, 8, 9, 18-22), przeciwmutageną i przeciwnowotworową (8, 14, 21, 23-25).

Olej z pieprzu czarnego działa na niektóre pasożyty i ma zastosowanie jako repelent (8, 26). Wyciągi, olejek eteryczny i olej, otrzymywane z owoców *Piper nigrum*, zawierają szereg leczniczych składników. W olejku (zawartość ok. 3,5%) dominują m.in.: limonen, β -kariofilen, α -felandren. W mniejszych ilościach są wytwarzane związki, tj. sabinen, myrcen, linalol, α - i β -pinen, α -humulen, p-cymen, alkaloidy piperydynowe, piperydyna, skrobia, taniny i kumaryny (1, 8, 9, 27). Otrzymywane z pieprzu czarnego wyciągi i olejek eteryczny działają na niektóre drobnoustroje (1, 2, 7-9, 27-32). Jednak w dostępnym piśmiennictwie brakuje opisów działania przeciwgrzybiczego oleju otrzymywanego z owoców zielonego pieprzu.

Cel pracy

Badania miały na celu ocenę wrażliwości na olej z owoców zielonego pieprzu szczepów grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z jamy ustnej od pacjentów z kandydozą.

Materiał i metody

Do badań wykorzystano 16 szczepów grzybów drożdżopodobnych wyhodowanych z jamy ustnej od

15 pacjentów, u których stwierdzono kandydozę. Pobrane materiały posiewano na podłoże Sabourauda i inkubowano przez 24-48 godz. w temp. 37°C, w warunkach tlenowych. Następnie wyhodowane szczepy zidentyfikowano na podstawie morfologii komórek w preparacie barwionym metodą Grama, morfologii kolonii i ich wzrostu na podłożu CHROMagar Candida (Bio Rad), cech biochemicznych (test API 20C AUX, bioMérieux), wytwarzania chlamydosporów i filamentacji. Zidentyfikowane szczepy należały do następujących gatunków: *Candida albicans* (3 szczepy), *C. glabrata* (3), po 1 szczepie z gatunku: *C. guilliermondii*, *C. kefir*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis*, *C. utilis* oraz *C. tropicalis* (2), *Rhodotorula mucilaginosa* (1) i *S. cerevisiae* (1) oraz 5 szczepów wzorcowych, w tym *C. albicans* ATCC 900, *C. glabrata* ATCC 66032, *C. krusei* ATCC 4130, *C. parapsilosis* ATCC 22019 i *C. tropicalis* ATCC 750.

Wrażliwość wyżej wymienionych szczepów na olej z owoców zielonego pieprzu (Sri Lanka) oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze Sabourauda. Oceniano stężenia wynoszące 1,25; 2,5; 5,0; 10,0 i 20,0 mg/ml. Użyte inokulum, zawierające 10⁵ CFU/kroplę, nanoszono aparatem Steersa na powierzchnię podłoża z dodatkiem lub bez dodatku oleju pieprzowego (kontrola wzrostu szczepów). Hodowlę posiewów prowadzono w warunkach tlenowych w temp. 37°C przez 24 godz. Za MIC uznano takie najmniejsze

rozcieńczenie badanego oleju, które całkowicie hamowało wzrost testowanych szczepów grzybów.

Wyniki badań i omówienie

Wyniki badań wrażliwości na olej z zielonego pieprzu 16 szczepów grzybów wyizolowanych od pacjentów zostały zebrane w tabeli 1, a 5 szczepów wzorcowych w tabeli 2. Największą wrażliwością wśród szczepów z rodzaju *Candida* charakteryzowały się gatunki *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis* i *C. utilis*. Stężenia hamujące ich wzrost wynosiły poniżej 1,25 mg/ml. Olej był nieznacznie mniej aktywny wobec szczepów z gatunku *Candida albicans* (MIC < 1,25-2,5 mg/ml) i szczepów *C. glabrata* (MIC 1,25-5,0 mg/ml). Najniższą wrażliwością charakteryzowały się szczepy grzybów z gatunku *C. kefir*, *C. krusei* i *C. tropicalis* (MIC ≥ 20,0 mg/ml). Badany olej z zielonego pieprzu był też wysoce aktywny w przypadku szczepów innych badanych rodzajów grzybów, w tym z gatunku *Rhodotorula mucilaginosa* i *Saccharomyces cerevisiae*. Ich wzrost był hamowany w niskich stężeniach, wynoszących < 1,25 mg/ml.

Sasidharan i Menon (1) oceniali wrażliwość na olejek eteryczny otrzymany z owoców pieprzu czarnego (*Piper nigrum* L.) szczepów grzybów drożdżopodobnych i wykazali jego wysoką aktywność wobec szczepu *Candida albicans* (MIC = 5 µg/ml) oraz *S. cerevisiae* (1,2 µg/ml). Natomiast testowany przez tych

Tab. 1. Wrażliwość 16 szczepów grzybów drożdżopodobnych na olej z zielonego pieprzu (*Piper nigrum*)

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≥ 20,0	10,0	5,0	2,5	1,25	< 1,25
<i>Candida albicans</i>	3				1		2
<i>Candida glabrata</i>	3	1		1		1	
<i>Candida guilliermondii</i>	1						1
<i>Candida kefir</i>	1	1					
<i>Candida krusei</i>	1	1					
<i>Candida lusitaniae</i>	1		1				
<i>Candida parapsilosis</i>	1						1
<i>Candida tropicalis</i>	2	2					
<i>Candida utilis</i>	1						1
Rodzaj <i>Candida</i> ogółem	14	5	1	1	1	1	5
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	1						1
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1						1
Grzyby drożdżopodobne łącznie	16	5	1	1	1	1	7

Tab. 2. Wrażliwość 5 szczepów wzorcowych grzybów drożdżopodobnych na olej z zielonego pieprzu (*Piper nigrum*)

Grzyby drożdżopodobne	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≥ 20,0	10,0	5,0	2,5	1,25	< 1,25
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	1						1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 66032	1					1	
<i>Candida krusei</i> ATCC 4130	1	1					
<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019	1						1
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	1	1					

autorów wyciąg z liści czarnego pieprzu był nieznacznie mniej aktywny wobec badanych szczepów. MIC dla *Candida albicans* wynosiło 7,0 µg/ml, a dla *S. cerevisiae* 2,5 µg/ml. Natomiast w innych badaniach, Triverdi i wsp. (9) wykorzystali metodę krążkowo-bibułową w ocenie aktywności dwóch ekstraktów, w tym wodnego i metanolowego z owoców pieprzu czarnego, wobec szczepów grzybów drożdżopodobnych. Ekstrakty były aktywne wobec szczepów z gatunku *Candida albicans*. Autorzy uzyskali zróżnicowane strefy zahamowania wzrostu badanych szczepów. W przypadku wodnego ekstraktu i użytych stężeń 5,0; 7,0 i 10,0 mg/ml strefa ta wynosiła odpowiednio: 15, 17 i 18 mm, a dla ekstraktu metanolowego: 14, 15 i 19 mm.

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań, można stwierdzić, że olej z owoców zielonego pieprzu wykazuje znaczną aktywność wobec badanych szczepów grzybów drożdżopodobnych.

Wnioski

1. Olej z owoców zielonego pieprzu odznacza się znaczną aktywnością przeciwgrzybiczą.
2. Największą wrażliwością charakteryzowały się szczepy z gatunków *C. guilliermondii*, *C. parapsilosis*, *C. utilis*, *R. mucilaginosa* i *S. cerevisiae*.
3. Olej z zielonego pieprzu był najmniej aktywny wobec szczepów z gatunków *C. kefir*, *C. krusei* i *C. tropicalis*.

Piśmiennictwo

1. Sasidharan I, Menon AN. Comparative chemical composition and antimicrobial activity and leaf essential oils of *Piper nigrum* L. Int J Biol Med Res 2010; 1(4):215-8.
2. Ghori I, Ahmad SS. Antibacterial activities of honey, sandal oil and black pepper. Pak J Bot 2009; 41(1):461-6.
3. Srinivasan K. Black pepper and its pungent principle-piperidine. A review of diverse physiological effect. Crit Rev Food Sci Nutr 2007; 41:735-48.
4. Valezques-Olivencia W, Shah P, Pitchumoni CS. The effect of red and black pepper on orocecal transit time. J Am Coll Nutr 1992; 1(2):228-31.
5. Pratibha N, Saxena VS, Amit A i wsp. Anti-inflammatory activities of Aller-7, a novel polyherbal formulation for allergic rhinitis. Int J Tissue React 2004; 26(1-2):43-51.
6. Hussain A, Naz H, Shinwari AK. Tissue culture of Black pepper (*Piper nigrum* L.) in Pakistan. Pak J Bot 2011; 43:1069-78.
7. Chatterjee S, Niaz Z, Gautam S i wsp. Antioxidant activity of some phenolic constituents from Green pepper (*Piper nigrum* L.) and fresh nutmeg mace (*Miristica fragrans*). Food Chem 2007; 101:515-23.
8. Rashmi SK, Sathya E, Devi PS. Isolation of piperidine from *Piper nigrum* and its antiproliferative activity. African J Pharm Pharmacol 2010; 4:562-73.
9. Triverdi MN, Khemani A, Vachhami UD i wsp. Pharmacognostic, phytochemical, analysis and antimicrobial activity of two piper species. Pharm Globale (Int J Compreh Pharm) 2011; 7(2):1-4.
10. Parganiha R, Verma S, Chandraker S i wsp. In vitro antiasthmatic activity of fruit extract of *Piper nigrum* (Piperaceae). Int J Herb Drug Res 2011; 1:15-8.
11. Parmer VS, Jain SC, Brisht KS i wsp. Phytochemistry of the genus Piper. Phytochem 1997; 46:597-673.
12. Kang MJ, Cho JY, Shim I i wsp. Bioavailability enhancing activities of natural compounds from medical plants. J Med Plants Res 2009; 3:1204-11.
13. Singh NK, Kumar P, Gupta DK i wsp. UV-Spectrophotometric method development for estimation of piperidine in Chirakadi Vato. Pharm Lett 2011; 3:178-82.
14. Ibrahim M, Nane KM, Anjum A. Hepatoprotective activity of *Sapindus mukorossi* and *Rheum emodi* extracts. In vitro and in vivo studies. World J Gastroenterol 2008; 16:2566-71.

15. Singh A, Duggal S. Piperidine – review of advances in pharmacology. *Inter J Pharm Sci Nanotech* 2009; 2:615-20.
16. Ravindran PN. Black pepper. *Piper nigrum*: Medicinal and aromatic plants – industrial profiles. Center for Medical Plants Research, Kerala, India 2000.
17. Ao P, Hu S, Zhao A. Essential oils analysis and trace element study of the roots of *Piper nigrum*. *J Zhongguo Zhong Yao Za Zhi* 1998; 23(1):42-63.
18. Gulcin I. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seed. *Int J Food Sci Nutr* 2005; 56:491-9.
19. Saxena R, Venkaiah K, Anitha P i wsp. Antioxidant activity of commonly consumed plant food of India contribution of their phenolic contents. *Int J Food Sci Nutr* 2007; 58:250-60.
20. Vijayakumar RS. Antioxidant efficacy of black pepper (*Piper nigrum* L.) and piperidine in rats with high fat diet induced oxidative stress. *Redox Rep* 2004; 9:105-10.
21. Selvendiran K, Sakthisekaran D. Chemoprotective effect of piperine on modulating lipid peroxidation and membrane bound enzymes in benzo(α)pyrene induced lung carcinogenesis. *Biomed Pharmacother* 2004; 58:264-7.
22. Sing G, Marimuthu P, Catalan C i wsp. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. *J Sci Food Agric* 2004; 84:1878-84.
23. Ahmad N, Fazal H, Abbasi BH i wsp. Efficient regeneration and antioxidant potential in regenerated-tissues of *Piper nigrum* L. *Plan Cell Tissue Orojan Cult* 2010; 102:129-34.
24. Mona AM, Abo-Zeid A, Ayman A i wsp. Activity of piperine against mitomycin C reduced sister chromatid exchanges and chromosomal aberrations in mice. *Natur Sci* 2009; 7:72-8.
25. Muhtaseb MS, Talwar D, Duncan A i wsp. Free radical activity and lipid soluble anti-oxidant vitamin status in patients with long-term ileal pouch-anal anastomosis. *Colorect Dis* 2008; 11:67-72.
26. Naseem MT, Khan RR. Comparison of repellency of essential oils against red flour beetle *Tribolium castaneum* Herbs't (*Coleoptera: Tenebrionidae*). *J Stoved Prod Pastharvest Res* 2011; 2:131-4.
27. Stoyanova A, Denkova Z, Nenor N i wsp. C₂H₂F₄ – SCFE-oleoresin on black pepper (*Piper nigrum* L.) and ginger (*Zingiber officinale* L.) (Rosc.) from Vietnam: Antimicrobial testing, gas chromatographic analysis and oilfactoric evaluation. *Electron J Environ Agric Food Chem* 2006; 5(5):1615-23.
28. Nanasombat S, Lohasupthawee P. Antibacterial activity of crude ethanolic extracts and essential oils of spices against *Salmonella* and other *Enterobacteriaceae*. *KMITL Sci Technol J* 2005; 3:527-38.
29. Ilondu EM, Iloh AC. Inhibition of three fungal isolates from Sorrel Dring (Zobo) using hurdle technique. *World J Agric Sci* 2007; 3(3):339-43.
30. Pradhan KJ, Variyar PS, Bandekar JR. Antimicrobial activity of novel phenolic compounds from green pepper (*Piper nigrum* L.). *Lebensm Wiss Technol* 1999; 32:121-3.
31. Umit A, Kadir I, Akgun KO. Antifungal activity of aqueous extracts of spices against bean rust (*Uromyces appendiculatus*). *Allelopathy J* 2009; 24:5046-8.
32. Erturk O. Antibacterial and antifungal activity of ethanolic extracts from eleven spice plants. *Biologia (Bratislava)* 2006; 61:275-8.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 15.09.2016

zaakceptowano/accepted: 21.11.2016

Adres/address:

*prof. dr hab. n. med. Anna Kędzia

ul. Małachowskiego 5/5

80-262 Gdańsk Wrzeszcz

e-mail: anak@gumed.edu.pl