

*Anna Kędzia¹, Andrzej W. Kędzia²

Działanie *in vitro* olejku eukaliptusowego (*Oleum Eucalypti*) na bakterie mikroaerofilne

The activity *in vitro* of eucalyptus oil (*Oleum Eucalypti*) to microaerophilic bacteria

¹Emerytowany profesor dr hab. n. med. Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

²Katedra Auksologii Klinicznej i Pielęgniarstwa Pediatricznego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkiewicza w Poznaniu

Kierownik Katedry: dr hab. n. med. Andrzej W. Kędzia, prof. nadzw.

SUMMARY

Introduction. The essential oil (*Eucalyptus globulus*, family *Myrtaceae*) is a widely used in medicine as analgesic, anti-inflammatory and antipyretic. It is applied in cosmetics, food and pharmaceutical industries. The essential oil is obtained by the steam distillation of leaves of the plant. Major constituents of the oil is 1,8-cyneoole. Oil contains among others: α - and β -pinene, p-cymene, camphene, γ -terpinene, d-limonene, α -phelandrene, allo-aromadendrene, aromadendrene, globulol, aldehydes (myrtenal) and ketones (carvone and pinocarvone). *Eucalyptus* oil possesses antibacterial, antiviral, antifungal, anti-protozoa and insecticidal activity.

Aim. The aim of this study was to investigate the susceptibility of microaerophilic bacteria to eucalyptus oil.

Material and methods. The bacteria were isolated from oral cavity. A total 26 strains of isolated from patients and 6 reference strains were tested. The susceptibility (MIC) was determined two fold dilution method in *Brucella* agar supplemented with 5% sheep blood. Concentration of oil used were: 0.06, 0.12, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml. The inoculum containing 10^5 CFU/spot was transferred with Steers replicator upon the surface of agar which containing appropriate eucalyptus oil (*Semifarm*) concentrations as well upon that with no oil added (strains growth control). Incubation was performed for 48 hrs at 37°C in anaerobic jar and microaerophilic conditions (*CAMPY* Pak, *BBL*) or anaerobic conditions for control strains. The MIC was defined as the lowest concentrations of oil that completely inhibited the growth of tested bacterial strains.

Results. The results of investigation indicated, that the most susceptible to eucalyptus oil were the strains from the species of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. MIC for 50% strains was ≤ 0.06 mg/ml, and for another 33% of the strains from 0.25 to 1.0 mg/ml. The oil showed good activity against the *Eikenella corrodens* strains. The growth of 55% of the strains was inhibited with range ≤ 0.06 -0.12 mg/ml. The strains from the species of *Campylobacter sputorum* were the lowest sensitive to eucalyptus oil (MIC for 60% strains was ≥ 4.0 mg/ml).

Conclusions. The eucalyptus oil showed good activity against tested microaerophilic bacteria. The most susceptible to oil were the strains from species of *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. The Gram-negative rods *Campylobacter sputorum* were the lowest sensitive to eucalyptus oil.

Keywords: susceptibility, microaerophilic bacteria, infection, eucalyptus oil, oral cavity

STRESZCZENIE

Wstęp. Olejek eukaliptusowy (*Eucalyptus globulus*, rodzina *Myrtaceae*) jest często stosowany w medycynie, jako środek przeciwbólowy, przeciwzapalny i przeciwgorączkowy. Jest on też używany w kosmetyce, żywności i przemyśle farmaceutycznym. Olejek uzyskuje się z liści rośliny drogą destylacji z parą wodną. Głównym jego składnikiem jest 1,8-cyneoole. Wśród innych związków, które zawiera, są: α - i β -pinen, p-cymen, kamfen, γ -terpinen, d-limonen α -felandren, alloaromadendren, aromadendren, globulol, aldehydy (myrtenal) i ketony (karwon i pinokarwon). Olejek eukaliptusowy wykazuje właściwości przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe i przeciwgrzybicze, ponadto oddziałuje przeciw pierwotniakom i insektom.

Cel pracy. Celem badań była ocena wrażliwości bakterii mikroaerofilnych na olejek eukaliptusowy.

Materiał i metody. Bakterie zostały wyizolowane z jamy ustnej. Badaniom poddano ogółem 26 szczepów pochodzących od pacjentów i 6 szczepów referencyjnych. Wrażliwość (MIC) drobnoustrojów oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% krwi baraniej. Inokulum zawierające 10^5 jtk/kroplę наносono aparatem Steersa na powierzchnię agaru zawierającego odpowiednie rozcieńczenie olejku eukaliptusowego (*Semifarm*) lub bez niego (kontrola wzrostu szczepów). Użyto następujących stężeń olejku: 0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 mg/ml. Inkubację posiewów prowadzono w anaerostatach w warunkach mikroaerofilnych (*CAMPY* Pak, *BBL*) oraz w warunkach beztlennowych (dla szczepów wzorcowych) przez 48 godz. w 37°C. Za MIC zostało przyjęte takie najmniejsze stężenie olejku, które całkowicie hamowało wzrost badanych szczepów bakterii.

Wyniki. Wyniki badań wskazują, że najbardziej wrażliwe na olejek eukaliptusowy były szczepy z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. MIC dla 50% wymienionych szczepów wynosiło $\leq 0,06$ mg/ml, a dla kolejnych 33% szczepów od 0,25 do 1,0 mg/ml. Olejek wykazał dużą aktywność wobec szczepów *Eikenella corrodens*. Wzrost 55% tych szczepów był hamowany w zakresie stężeń $\leq 0,06-0,12$ mg/ml. Pałeczki z gatunku *Campylobacter sputorum* były mniej wrażliwe na olejek eukaliptusowy (MIC dla 60% szczepów wynosiło $\geq 4,0$ mg/ml).

Wnioski. Olejek eukaliptusowy wykazał dużą aktywność wobec badanych bakterii mikroaerofilnych. Najbardziej wrażliwe na olejek były szczepy z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Szczepy Gram-ujemnych pałeczek z gatunku *Campylobacter sputorum* okazały się najmniej wrażliwe na badany olejek eukaliptusowy.

Słowa kluczowe: wrażliwość, bakterie mikroaerofilne, zakażenie, olejek eukaliptusowy, jama ustna

Wstęp

W składzie flory bakteryjnej jamy ustnej, poza dominującymi beztlenowcami, występują też bakterie mikroaerofilne. Do wzrostu wystarcza im obecność od 5 do 20% tlenu. Uznaje się je za drobnoustroje oportunistyczne ze względu na możliwość powodzenia zakażeń lub uczestnictwa w zakażeniach mieszanych, zarówno w jamie ustnej, jak i poza nią. Ich obecność stwierdzono w bakteryjnej błonie nazębnej (*dental plaque*) oraz w kieszonkach przyzębnych (1-5). Niektóre gatunki tych bakterii mogą być przyczyną chorób przyzębia, ropni okołozębowych, zakażeń miazgi zęba, dziąseł i ropni okołointplantowych. Ponadto uczestniczą w chorobach różnych narządów, w tym sercowo-naczyniowych, lub je powodują.

Zioła były wykorzystywane w leczeniu od starożytności. Kolejne wieki dostarczały nowych informacji, poszerzając możliwości wykorzystywania ich w celach terapeutycznych i profilaktycznych. Badania dowiodły, że substancje ziołowe, a szczególnie olejki eteryczne, charakteryzują się szerokim działaniem, w tym przeciwzapalnym, przeciwbólowym, ściągającym i przeciwdrobnoustrojowym.

Olejek eukaliptusowy jest otrzymywany z eukaliptusa gałkowego (*Eucalyptus globulus* Lab., rodzina *Myrtaceae*). Drzewo należy do szybko rosnących i osiąga wysokość nawet do 60 m. Uprawiane głównie w Australii i na Tasmanii, a obecnie także w Indonezji, Nowej Zelandii i Indiach. Liście drzewa są wykorzystywane do produkcji olejku eukaliptusowego, na drodze destylacji z parą wodną.

Przeważającym składnikiem olejku jest eukaliptol (1,8-cyneol), którego zawartość może wynosić do 90% (6-12). W mniejszych ilościach są też wytwarzane monoterpény, a wśród nich: α - i β -pinen, p-cymen, kamfen, γ -terpinen, d-limonen i α -felandren; seskwiterpény, obejmujące: alloaromadendren, aromadendren i globulol; aldehydy (myrtenal) oraz ketony (karwon i pinokarwon) (7-9, 11, 13-24).

Olejek jest stosowany przede wszystkim w zakażeniach dróg oddechowych, chorobach skóry,

artretyzmie i reumatyzmie (8, 9, 14, 16, 25-30). Z badań różnych autorów wynika, że olejek eukaliptusowy ma działanie przeciwbakteryjne, przeciwgrzybicze, przeciwwirusowe, działa także przeciw pierwotniakom i przeciw insektom (26, 28, 31-42). Jednak w piśmiennictwie brakuje danych na temat aktywności olejku wobec bakterii rosnących w warunkach mikroaerofilnych.

Cel pracy

Celem badań była ocena wrażliwości na olejek eukaliptusowy bakterii mikroaerofilnych pochodzących z jamy ustnej.

Materiał i metody

Bakterie mikroaerofilne wykorzystane w badaniach zostały wyizolowane z materiałów, które pobrano z jamy ustnej pacjentów. Doświadczenia objęły łącznie 32 szczepy, w tym 26 szczepów pochodzących od pacjentów, należących do gatunków *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (12 szczepów), *Campylobacter sputorum* (5), *Eikenella corrodens* (9) oraz 6 szczepów wzorcowych z gatunków *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Bacteroides ovatus* ATCC 8483, *Bacteroides vulgatus* ATCC 8482, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25286, *Propionibacterium acnes* ATCC 11827 i *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337.

Do badań wykorzystano olejek eukaliptusowy firmy Semifarm. Wrażliwość (MIC) bakterii oznaczono metodą seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% krwi baraniej. Olejek rozpuszczano w dwumetylosulfotlenku (DMSO, Serwa), a następnie dodawano do jałowej wodzy destylowanej w celu uzyskania stężeń wynoszących: 0,06, 0,12, 0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 mg/ml. Inokulum, zawierające 10^5 jtk (jednostek tworzących kolonie) w jednej kropli, наносono aparatem Steersa na powierzchnię agaru zawierającego odpowiednie rozcieńczenie olejku eukaliptusowego. Kontrolę wzrostu szczepów stanowiło podłoże niezawierające olejku. Inkubację podłoży prowadzono w 37°C przez 48 godz., w anaerostatach

w warunkach mikroaerofilnych (CAMPY Pak, BBL) oraz w warunkach beztlenowych (dla szczepów wzorcowych). Za MIC przyjmowano najmniejsze stężenie olejku, które całkowicie hamowało wzrost badanych szczepów bakterii.

Wyniki i omówienie

Uzyskane wyniki wrażliwości bakterii mikroaerofilnych na olejek eukaliptusowy zostały przedstawione w tabeli 1, a szczepów wzorcowych w tabeli 2. Spośród wszystkich badanych szczepów 65% było wrażliwych na niskie stężenia olejku w zakresie $\leq 0,06$ -1,0 mg/ml. Pozostałe szczepy wymagały do zahamowania wzrostu stężeń wynoszących 4,0 mg/ml i wyższych. Największą wrażliwością charakteryzowały się Gram-ujemne pałeczki mikroaerofilne z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. Wartości MIC dla 50% tych szczepów wynosiły $\leq 0,06$ mg/ml, a dla kolejnych 33% szczepów od 0,25 do 1,0 mg/ml. Tylko 17% szczepów wymagało do zahamowania wzrostu stężeń w wysokości 4,0 mg/ml

lub wyższych. Pałeczki Gram-ujemne z gatunku *Eikenella corrodens* także okazały się wysoce wrażliwe na olejek. Spośród nich, wzrost 55% szczepów był hamowany w zakresie stężeń $\leq 0,06$ -0,12 mg/ml. Olejek był najmniej aktywny wobec szczepów z gatunku *Campylobacter sputorum*, z których więcej niż połowa wymagała do zahamowania wzrostu wyższych stężeń (MIC dla 60% szczepów wynosiło $\geq 4,0$ mg/ml).

Z wcześniejszych naszych badań aktywności olejku eukaliptusowego wobec bakterii beztlenowych wynika, że te drobnoustroje były mniej wrażliwe na olejek eukaliptusowy (39). Stężenia $\leq 0,06$ -1,0 mg/ml hamowały wzrost 57% szczepów bakterii beztlenowych, a 65% badanych obecnie bakterii mikroaerofilnych. Z badań wynika, że bakterie tlenowe wykazują zróżnicowaną wrażliwość na olejek, jednak do zahamowania wzrostu zwykle wymagają użycia wyższych stężeń. Aktywność olejku, wykorzystując różne metody badawcze wobec szczepów *Staphylococcus aureus*, wykazali Fit i wsp. (19), Vidya i Vidya (34), Trivedi

Tab. 1. Wrażliwość 26 szczepów bakterii mikroaerofilnych na olejek eukaliptusowy

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) olejku eukaliptusowego (mg/ml)						
		$\geq 4,0$	2,0	1,0	0,5	0,25	0,12	$\leq 0,06$
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i>	12	2		1	2	1		6
<i>Campylobacter sputorum</i>	5	3		1				1
<i>Eikenella corrodens</i>	9	4					1	4
Bakterie mikroaerofilne, ogółem	26	9		2	2	1	1	11

Tab. 2. Wrażliwość 6 szczepów wzorcowych bakterii beztlenowych na olejek eukaliptusowy

Drobnoustroje	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące (MIC) olejku eukaliptusowego (mg/ml)						
		$\geq 4,0$	2,0	1,0	0,5	0,25	0,12	$\leq 0,06$
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1	1						
<i>Bacteroides ovatus</i> ATCC 8483	1				1			
<i>Bacteroides vulgatus</i> ATCC 8482	1	1						
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25286	1	1						
<i>Propionibacterium acnes</i> ATCC 11827	1	1						
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1		1					

i Hotchandani (43), Ghalem i Mohamed (44), Yousef i wsp. (35) oraz Kumar i wsp. (38). Działanie wobec Gram-ujemnych pałeczek opisali Kędzia i wsp. (33), Delaquis i wsp. (37), Rosato i wsp. (45), Yousef i Tawil (35), Kalemba i Kunicka (32) oraz Kumar i wsp. (38).

Podsumowując wyniki przeprowadzonych badań, można zaznaczyć, że olejek eukaliptusowy wykazał dużą aktywność wobec ocenianych bakterii mikroaerofilnych.

Wnioski

1. Olejek eukaliptusowy był wysoce aktywny wobec testowanych bakterii mikroaerofilnych.
2. Najbardziej wrażliwe były Gram-ujemne pałeczki z gatunku *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*.
3. Olejek charakteryzował się najmniejszą aktywnością wobec szczepów z gatunku *Campylobacter sputorum*.

Piśmiennictwo

1. Magier DL, Ximenez-Fyvie LA, Haffajee AD i wsp. Distribution of selected bacterial species on intraoral surfaces. *J Clin Periodontol* 2003; 30:644-54.
2. Nishihara T, Koseki T. Microbial etiology of periodontitis. *Periodontology* 2004; 36:14-26.
3. Socransky SS, Haffajee AD. Periodontal microbial ecology. *Periodontology* 2005; 38:135-87.
4. Canigia LF, Moreira AN, Furman L i wsp. Microbial assessment of subgingival plaques from Argentinian patients with adult periodontitis. *Anaerobe* 1999; 5:263-5.
5. Soncini J, Kanasi E, Lu SC i wsp. Oral microbiota of children in a school-based dental clinic. *Anaerobe* 2010; 16:278-82.
6. Silva J, Abebe W, Sausa SM i wsp. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oils of *Eucalyptus*. *J Ethnopharmacol* 2003; 89:277-83.
7. Sacchetti G, Maietti S, Muzzoli M i wsp. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. *Food Chem* 2005; 91:621-32.
8. Balacs T. Cineole-rich-eucalyptus. *Int J Aromather* 1997; 8(2):15-21.
9. Sadlon AE, Lamson DW. Immune-modifying and antimicrobial effects of eucalyptus oil and simple inhalation devices. *Altern Med Rev* 2010; 15(1):33-46.
10. Upadhyay S. Essential oils: antimicrobial, anthelmintic, antiviral, anticancer and anti-insect properties. *J Appl Biosci* 2010; 36(1):1-22.
11. Pereira SI, Freire CSR, Netp CP i wsp. Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. *Flavour Fragr J* 2005; 20:407-9.
12. Pandey RR, Dubey RC, Saini S. Phytochemical and antimicrobial studies on essential oils of some aromatic plants. *Afric J Biotechnol* 2010; 9(28):4364-8.
13. Bacchir RG, Bengali M. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Afr J Pharm Pharmacol* 2008; 2(10):211-5.
14. Bhattaram VA, Graefe V, Kohler C i wsp. Pharmacokinetics and bioavailability of herbal medicinal products. *Phytomed* 2002; Suppl III. 9:1-33.
15. Indian Pharmacopoeia. Delhi: Government of India, Ministry of Health and Family Welfare – Controller of Publications 1996; Vol. 1:310.
16. Inoue S, Yamaguchi H, Takizawa T. Screening of the antibacterial effects of a variety of essential oils on respiratory tract pathogens, using a modified dilution assay method. *J Infect Chemother* 2001; 7:251-4.
17. Debbarma J, Kishore P, Nayak BB i wsp. Antibacterial activity of ginger, eucalyptus and sweet orange peel essential oils on fish-borne bacteria. *J Food Proc Preserv* 2013; 37:1022-30.
18. Bosnic T, Softic D, Grujic-Vasic J. Antimicrobial activity of some essential oils and major constituents of essential oils. *Acta Med Academ* 2006; 35:19-22.
19. Fit IN, Rapuntean G, Rapuntean S i wsp. Antibacterial effect of essential vegetal extracts on *Staphylococcus aureus* compared to antibiotics. *Not Bot Hort Agrobot Cluj* 2009; 37(2):117-23.
20. Inouye S, Takizawa T, Yamaguchi H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. *J Antimicrob Chemother* 2001; 47:565-73.
21. Meygalla SE, El-Keltrawi NEM, Ross SA. A study of antimicrobial action of some essential oil constituents. *Herba Pol* 1980; 26:181-6.
22. Damjanovic-Vratnica B, Dakov T, Sukovic D i wsp. Antimicrobial effects of essential oil isolated from *Eucalyptus globulus* Labill. from Montenegro. *Czech J Food Sci* 2011; 29(3):277-84.
23. Djenane D, Yanguela J, Amorouche T i wsp. Chemical composition and antimicrobial effects of essential oils of *Eucalyptus globules*, *Myrtus communis* and *Satureja hortensis* against *Escherichia coli* 0157:H7 and *Staphylococcus aureus* in minced beef. *Food Sci Technol Int* 2011; 17 (6):505-16.
24. Mulyaniningsih S, Sporer F, Reichling J i wsp. Antimicrobial activity of essential oils from eucalyptus and selected components against multidrug resistant bacterial pathogens. *Pharm Biol* 2011; 49(9):893-9.
25. Shumny D, Szypuła E, Szydłowski M i wsp. Leki roślinne stosowane w chorobach układu oddechowego. *Den Med Probl* 2007; 44(4):507-15.
26. Katiyar A, Singh D, Mishra BN. Essential oil: production for health care in current scenario. *Ann Biol Res* 2010; 1(3):200-9.
27. Prabuseenivasan S, Jayakumar M, Ignacimuthu S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Compl Altern Med* 2006; 6(39):1-8.
28. Cermelli C, Fabio A, Fabio G i wsp. Effect of eucalyptus essential oil on respiratory bacteria and viruses. *Curr Microbiol* 2008; 56:89-92.
29. Salari MH, Amine G, Shirazi MH i wsp. Antibacterial effects of *Eucalyptus globulus* leaves extract on pathogenic bacteria isolated from specimens of patients with respiratory tract disorders. *Clin Microbiol Infect* 2006; 12(2):194-6.

30. Bhat D, Sachan AK, Jains S i wsp. Studies on inhibitory effects of eucalyptus oil on sebaceous glands for the management of acne. *Ind J Nat Prod Res* 2011; 2(3):345-9.
31. Morris JA, Khettry A, Seitz EW. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Soc* 1979; 56:595-603.
32. Kalembe D, Kunicka A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr Med Chem* 2003; 10:813-29.
33. Kędzia B, Hołderna-Kędzia E. Badanie wpływu olejków eterycznych na bakterie, grzyby i dermatofity chorobotwórcze dla człowieka. *Post Fitoter* 2007; (2):71-7.
34. Vidya TJ, Vidya P. Antimicrobial activity of Scan Vet Cream. *Veterinary* 2000; 16(24):155-9.
35. Yousef RT, Tawil GG. Antimicrobial activity of volatile oils. *Pharmazie* 1980; 35(11):698-701.
36. Karpanen TJ, Worthington T, Hendry ER i wsp. Antimicrobial efficacy of chlorhexidine alone and with combination with eucalyptus oil, tea tree oil and thymol against planktonic and biofilm cultures of *Staphylococcus epidermidis*. *J Antimicrob Chemother* 2008; 62:1031-6.
37. Delaquis PJ, Stanich K, Girard B i wsp. Antimicrobial activity of individual and mixed fractions of dill, cilantro, coriander and eucalyptus essential oils. *Int J Food Microbiol* 2002; 74:101-9.
38. Kumar A, Sharma VD, Sing AK i wsp. Antibacterial properties of different eucalyptus oils. *Fitotherapy* 1988; 59:141-4.
39. Kędzia A. Działanie olejku eukaliptusowego na bakterie beztlenowe. *Post Fitoter* 2006; (4):183-7.
40. Maruzzella JC, Sicurella N. Antibacterial activity of essential oil vapors. *J Am Pharm Assoc* 1960; 49:692-4.
41. Takarada K, Kimizuka N, Takchashi K i wsp. A comparison of the antimicrobial efficiencies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol Immunol* 2004; 19:61-5.
42. Luangnarumitchai S, Lamlertthon S, Tiyaaboonchai W. Antimicrobial activity of essential oils against five strains of *Propionibacterium acnes*. *Mahidol Univ J Pharm Sci* 2007; 37(1-4):60-4.
43. Trivedi NA, Hotchandani SC. A study of the antimicrobial activity of oil of *Eucalyptus*. *Ind J Pharmacol* 2004; 36(2):93-5.
44. Ghalem BR, Mohamed B. Antibacterial activity of leaf essential oils of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus camaldulensis*. *Afric J Pharm Pharmacol* 2008; 2(10):211-5.
45. Rosato A, Vitali C, De Laurentis N i wsp. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. *Phytomed* 2007; 14:727-32.

Konflikt interesów**Conflict of interest**

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 21.07.2017

zaakceptowano/accepted: 10.08.2017

Adres/address:

*prof. dr hab. n. med. Anna Kędzia
ul. Małchowskiego 5/5, 80-262 Gdańsk Wrzeszcz
e-mail: anak@gumed.edu.pl