

*Anna Kędzia¹, Elżbieta Hołderna-Kędzia²

Oddziaływanie na bakterie beztlenowe olejku jałowcowego (*Oleum Juniperi*)

The influence of juniper oil (*Oleum Juniperi*) on anaerobic bacteria

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

²Instytut Włókien Naturalnych i Roślin Zielarskich w Poznaniu

Dyrektor Instytutu: dr hab. inż. Małgorzata Zimmiewska, prof. IWNiRZ

SUMMARY

Introduction. Juniper berries have been used in ancient folk medicine for treatment infections, as a spice for meat, and preparation of gin and raki. Juniper (*Juniperus communis* L.) belongs to the Cupressaceae family. It is an evergreen tree or shrub and achieve from 2 to 10 m high. Its berries produced essential oil, which contain α -pinene, camphene, limonene, cadinene, terpinen-4-ol, myrcene, β -pinene, sabinene, flavonoids, resins, organic acids, and tannins. The oil is used for treatment various diseases. It demonstrate antimicrobial properties.

Aim. The aim of the study was to investigate the susceptibility of anaerobic bacteria of oral cavity to juniper oil.

Material and methods. The 56 of anaerobic bacteria isolated from patients, in it Gram-negative rods (31 strains), Gram-positive cocci (13) Gram-positive rods (12) and 8 reference strains were tested. Investigation was carried out using the plate dilution technique in Brucella agar supplemented with 5% defibrinated sheep blood, menadione and hemin. Inoculum containing 10⁶ CFU per spot was seeded with Steers replicator upon the agar with oil or without the oil (strains growth control). Concentration of dated oil were: 2,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 and 20,0 mg/ml. The plate was incubated in anaerobic condition in anaerobic jar in 37°C for 48 hrs. The MIC was interpreted as the lowest concentration of juniper oil inhibiting the growth of tested bacteria.

Results and discussion. The results of the experiments indicated, that rods from Gram-negative anaerobes, the strains belonging to the genera of *Prevotella* and *Porphyromonas*, were the most susceptible to essential oil. The MIC's for the strains be within from 5,0 to 10,0 mg/ml. The lowest sensitive were the rods from genera *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Tannerella* (MIC \geq 20,0 mg/ml). From among Gram-positive cocci the most sensitive to oil were the strains from genus *Finegoldia magna*. The oil was active towards half of the strains in concentration \leq 2,5 mg/ml. The tested Gram-positive rods were the less sensitive (MIC 5,0- \geq 20,0 mg/ml). From this group, the strains *Actinomyces viscosus* demonstrated the sensitivity on 5,0 to 7,5 mg/ml. The most resistance were the rods *Actinomyces odontolyticus* and *Propionibacterium granulosum* (MIC \geq 20,0 mg/ml).

Conclusions. The lowest susceptible to juniper oil from Gram-negative bacteria were genus of *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *Tannerella*. The oil was the most active against strains of *Prevotella* and *Porphyromonas*. The cocci were the more susceptible than Gram-positive rods. The Gram-positive anaerobes showed high susceptibility to juniperus oil than Gram-negative rods.

Keywords: susceptibility, anaerobic bacteria, juniper oil, oral cavity

STRESZCZENIE

Wstęp. Jałowiec był używany w starożytności w medycynie ludowej do leczenia zakażeń, jako przyprawa do mięsa i do przygotowywania dżinu oraz raki. Jałowiec (*Juniperus communis* L.) należy do rodziny Cupressaceae. Jest wiecznie zielonym drzewem lub krzewem i osiąga 2-10 m wysokości. Jego owoce wytwarzają olejek eteryczny, który zawiera α -pinen, kamfen, limonen, kadynen, terpinen-4-ol, myrcen, β -pinen, sabinen, flawonoidy, żywice, kwasy organiczne i garbniki. Stosowany jest do leczenia różnych chorób. Wykazuje też działanie przeciwdrobnoustrojowe.

Cel. Celem badań była ocena wrażliwości na olejek jałowcowy bakterii beztlenowych jamy ustnej.

Materiały i metody. Zbadano ogółem 56 szczepów bakterii beztlenowych izolowanych od pacjentów, w tym Gram-ujemne pałeczki (31 szczepów), Gram-dodatnie ziarniaki (13) i Gram-dodatnie pałeczki (12) oraz 8 szczepów wzorcowych. Doświadczenie przeprowadzono techniką seryjnych rozcieńczeń w agarze Brucella z dodatkiem 5% krwi baraniej, menadionu i heminy. Zawiesinę zawierającą 10⁶ drobnoustrojów na kroplę przenoszono aparatem Steersa na powierzchnię agaru zawierającego olejek jałowcowy lub bez niego (kontrola wzrostu szczepów). Użyte stężenia wynosiły: 2,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml. Podłoża inkubowano w warunkach beztlenowych w anaerostatach wypełnionych mieszaniną gazów; 10% CO₂, 10% H₂ i 80% N₂, zawierających katalizator palladowy oraz wskaźnik beztlenowości, w temp. 37°C przez 48 godzin. Za MIC przyjęto takie najmniejsze rozcieńczenie olejku, które całkowicie hamowało wzrost badanych bakterii beztlenowych.

Wyniki i omówienie. Wyniki badań wskazują, że Gram-ujemne pałeczki z rodzaju *Prevotella*, *Porphyromonas* były najbardziej wrażliwe na olejek jałowcowy. Wartości MIC's dla tych szczepów wynosiły 5,0-10,0 mg/ml. Mniej wrażliwe były pałeczki z rodzaju *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Tannerella* (MIC \geq 20,0 mg/ml). Spośród Gram-dodatnich ziarniaków największą wrażliwością na olejek charakteryzował się gatunek *Finegoldia magna*. Olejek hamował wzrost połowy tych szczepów w stężeniach \leq 2,5 mg/ml.

Badane Gram-dodatnie pałeczki okazały się bardziej odporne (MIC od 5,0 do $\geq 20,0$ mg/ml). Spośród nich najbardziej wrażliwe były szczepy *Actinomyces viscosus* (MIC 5,0-7,5 mg/ml). Natomiast największą oporność wykazały pałeczki *Actinomyces odontolyticus* i *Propionibacterium granulosum* (MIC $\geq 20,0$ mg/ml).

Wnioski. Spośród Gram-ujemnych bakterii najmniej wrażliwe na olejek jałowcowy były pałeczki z rodzaju *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Tannerella*. Olejek wykazał największą aktywność wobec szczepów *Prevotella* i *Porphyromonas*. Gram-dodatnie ziarniaki okazały się bardziej wrażliwe niż Gram-dodatnie pałeczki. Gram-dodatnie beztlenowce były bardziej wrażliwe na olejek jałowcowy w porównaniu z Gram-ujemnymi pałeczkami.

Słowa kluczowe: wrażliwość, bakterie beztlenowe, olejek jałowcowy, jama ustna

Wstęp

Jałowiec pospolity (*Juniperus communis* L.), zaliczany do rodziny *Cupressaceae* (cyprysowate) był znany starożytnym Egipcjanom i Grekom. W Egipcie wykorzystywano go do namaszczenia zwłok przed balsamowaniem. We Francji był środkiem do okadzania pomieszczeń podczas epidemii ospy (1870 r.), a w Anglii do zwalczania zachorowań na cholere i dur plamisty. W Europie Środkowej wykorzystywano go do leczenia chorych na cholere, tyfus, czerwonkę i zakażonych tasiemcem. Nadal stosowany jest w Tybecie i Meksyku jako oczyszczające kadzidło.

Nazwa jałowca pochodzi od słowa łacińskiego *juniores*, które oznacza „młode jagody”. Od wieków jałowiec był używany w medycynie ludowej do leczenia zakażeń, a także jako przyprawa do mięsa, sosów, produkcji napojów alkoholowych (dżinu, rakii) (1-3). Jałowiec, wiecznie zielony krzew lub drzewo, może osiągać 2-10 m wysokości. Wytwarza korę, która początkowo ma barwę żółtobrazową, a następnie szarobrunatną. Liście są w postaci równowąskich, lancetowatych igieł. Tworzy kwiaty barwy żółtej i niebieskiej, zebrane w bazie. Owoce jałowca (szyszkojagody) mają kolor czarnoniebieski.

Otrzymywane z nich ekstrakty stosowane są w terapii w celu obniżenia ciśnienia tętniczego krwi, w żylakach, otyłości, reumatyzmie, artretyzmie i zaburzeniach przewodzenia pokarmowego. Wykorzystywane są jako środki diuretyczne, przeciwbólowe, uspokajające, działające przeciwtrądzikowo, przeciwłupieżowo i przeciwłojotokowo (3-5). Stosowane są też w formie inhalacji, kąpieli, masaży i kompresów. Z badań wynika, że jałowiec wykazuje działanie napotne, odtruwające, stymulujące odporność, owadobójcze i przeciw pasożytnicze.

Owoce jałowca wytwarzają od 0,5 do $\geq 2,0\%$ olejku eterycznego (6, 7). Jest on otrzymywany z jagód i gałązek metodą destylacji z parą wodną. Zawiera wiele związków chemicznych, w tym: α -pinen, kamfen, limonen, kadynen, terpinen-4-ol, myrcen, β -pinen, sabinen, flawonoidy, żywice, kwasy organiczne i garbniki (2-11). Ponadto z przeprowadzonych badań wynika, że jałowiec ma właściwości przeciwutleniające oraz

przeciwnowotworowe (3, 7-9, 12-14, 16-18). Niektóre składniki olejku eterycznego są odpowiedzialne za działanie przeciwdrobnoustrojowe (3-5, 7-9, 14, 16-18).

Dotychczasowe wyniki badań wskazują na przeciwbakteryjną i przeciwwirusową aktywność olejku jałowcowego. W piśmiennictwie brakuje natomiast informacji na temat wrażliwości na ten olejek bakterii beztlenowych.

Cel pracy

Celem pracy była ocena wrażliwości na olejek jałowcowy bakterii beztlenowych wyizolowanych od pacjentów z zakażeniami jamy ustnej.

Materiał i metody badań

Bakterie beztlenowe wykorzystane do badań zostały wyhodowane z materiałów pobranych od pacjentów z zakażeniami jamy ustnej. Ocenie wrażliwości poddano 56 szczepów, w tym Gram-ujemne pałeczki (31 szczepów), Gram-dodatnie ziarniaki (13) i Gram-dodatnie pałeczki (12) oraz 8 szczepów wzorcowych z gatunków: *Bacteroides fragilis* ATCC 25285, *Prevotella loescheii* ATCC 15930, *Porphyromonas levii* ATCC 29147, *Porphyromonas asaccharolytica* ATCC 29743, *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586, *Bifidobacterium breve* ATCC 15700, *Fingoldia magna* ATCC 29328 i *Peptostreptococcus anaerobius* ATCC 27337.

Badanie wrażliwości (MIC) wymienionych wyżej szczepów na olejek jałowcowy (Avicenna-Oil, Wrocław) przeprowadzono z wykorzystaniem metody seryjnych rozcieńczeń w agarze *Brucella* z dodatkiem 5% krwi baraniej, menadionu i heminy. Najpierw olejek jałowcowy został rozpuszczony w 1 ml DMSO (Serva), a następnie w wodzie destylowanej. Badane rozcieńczenia olejku wynosiły: 2,0, 5,0, 7,5, 10,0, 15,0 i 20,0 mg/ml. Zawiesina, która zawierała 10^6 drobnoustrojów na kroplę, była przenoszona na powierzchnię agaru aparatem Steersa. Podłoża z posiewami i kontrolne (bez dodatku olejku) hodowano w warunkach beztlenowych w anaerostatach wypełnionych mieszaniną gazów: 10% CO_2 , 10% H_2 i 80% N_2 , w obecności katalizatora palladowego oraz wskaźnika beztlenowości, w temperaturze 37°C przez 48 godzin.

Za MIC przyjęto takie najmniejsze rozcieńczenie olejku, które całkowicie hamowało wzrost badanych bakterii beztlenowych.

Wyniki i omówienie

Wyniki badań Gram-ujemnych bakterii zamieszczono w tabeli 1, Gram-dodatnich drobnoustrojów w tabeli 2, a szczepów wzorcowych w tabeli 3. Wśród testowanych bakterii beztlenowych tylko 10 (17,6%) szczepów wykazało wrażliwość na niskie stężenia olejku, wynoszące $\leq 2,0$ - $5,0$ mg/ml. Kolejne rozcieńczenia w zakresie $5,0$ - $7,5$ mg/ml hamowały wzrost 11 (19,6%) szczepów. Jednak prawie połowa (46,4%) testowanych bakterii była wrażliwa na stężenie $\geq 20,0$ mg/ml. Wśród Gram-ujemnych pałeczek największą aktywność olejek wykazał wobec Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Prevotella* i *Porphyromonas*. Wartości MIC dla 7 (58,3%) szczepów wynosiły od $5,0$ do $10,0$ mg/ml. Najmniej wrażliwe okazały się szczepy z rodzaju *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Tannerella*. Ich wzrost hamowały stężenia wynoszące $20,0$ mg/ml i więcej. Spośród Gram-dodatnich bakterii wyższą wrażliwością charakteryzowały się Gram-dodatnie ziarniaki niż pałeczki. Spośród 13 szczepów wzrost 4 był hamowany przez stężenia w zakresie $\leq 2,5$ - $7,5$ mg/ml.

Olejek jałowcowy był najbardziej aktywny wobec szczepów z gatunku *Fingoldia magna*. Połowa badanych ziarniaków była wrażliwa na stężenie $\leq 2,5$ mg/ml.

Niższą wrażliwość wykazały Gram-dodatnie pałeczki. Oceniany olejek w stężeniach wynoszących $5,0$ - $7,5$ mg/ml hamował wzrost tylko 4 spośród 12 badanych szczepów. Najbardziej odporne na działanie olejku jałowcowego okazały się szczepy z gatunku *Propionibacterium granulosum*. Wzrost tych pałeczek był hamowany w stężeniach wynoszących $20,0$ mg/ml i wyższych. Natomiast największą wrażliwością charakteryzowały się Gram-dodatnie pałeczki z gatunku *Actinomyces viscosus*. Wartości MIC kształtowały się w zakresie $5,0$ - $7,5$ mg/ml. W podsumowaniu warto zaznaczyć, że w zakresie niższych stężeń, wynoszących $\leq 2,5$ - $7,5$ mg/ml, olejek jałowcowy działał aktywnie wobec Gram-dodatnich ziarniaków (liczba szczepów wrażliwych wynosiła 46,2% szczepów), a był najmniej skuteczny wobec Gram-ujemnych pałeczek (liczba szczepów wrażliwych wynosiła 25,8% szczepów).

Doświadczenia przeprowadzone przez innych autorów (3, 4, 11, 12, 18-20) potwierdziły przeciwdrobnoustrojowe działanie olejku jałowcowego. Badania przeprowadzono metodą krążkowo-dyfuzyjną, oceniając strefy zahamowania wzrostu szczepów. Stwierdzono aktywność olejku wobec bakterii *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Bacillus subtilis* NCTC 8236, *Micrococcus flavus* MFBF, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Staphylococcus aureus* MFBF, *Staphylococcus epidermidis* MFBF i *Enterococcus faecalis* MFBF (4). Kun

Tab. 1. Działanie olejku jałowcowego na Gram-ujemne bakterie beztlenowe

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		$\geq 20,0$	15,0	10,0	7,5	5,0	$\leq 2,5$
<i>Bacteroides fragilis</i>	2	2					
<i>Bacteroides uniformis</i>	1	1					
<i>Bacteroides ureolyticus</i>	2	2					
<i>Bacteroides vulgatus</i>	2	2					
<i>Parabacteroides distasonis</i>	1	1					
<i>Prevotella bivia</i>	2	2					
<i>Prevotella buccalis</i>	1		1				
<i>Prevotella intermedia</i>	4	1		1	1	1	
<i>Prevotella loescheii</i>	1					1	
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i>	4		1	1	1	1	
<i>Tannerella forsythia</i>	2	2					
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	5	2	1		1		1
<i>Fusobacterium necrophorum</i>	4	2		1	1		
Gram-ujemne bakterie beztlenowe ogółem	31	17	3	3	4	3	1

Tab. 2. Działanie olejku jałowcowego na Gram-dodatnie bakterie beztlenowe

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≥ 20,0	15,0	10,0	7,5	5,0	≤ 2,5
<i>Finegoldia magna</i>	6	1	2				3
<i>Parvimonas micros</i>	2		1		1		
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	5	2	1		1	1	
Gram-dodatnie ziarniaki beztlenowe ogółem	13	3	4		2	1	3
<i>Actinomyces odontolyticus</i>	2	1					1
<i>Actinomyces viscosus</i>	2				1	1	
<i>Propionibacterium acnes</i>	3	1	1		1		
<i>Propionibacterium granulosum</i>	4	4					
<i>Bifidobacterium breve</i>	1		1				
Gram-dodatnie pałeczki ogółem	12	6	2		2	1	1
Bakterie beztlenowe łącznie	56	26	9	3	8	5	5

Tab. 3. Działanie olejku jałowcowego na szczepy wzorcowe bakterii beztlenowych

Bakterie beztlenowe	Liczba szczepów	Najmniejsze stężenie hamujące MIC (mg/ml)					
		≤ 2,0	2,0	1,0	0,5	0,25	≤ 0,12
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	1			1			
<i>Porphyromonas levii</i> ATCC 29147	1					1	
<i>Porphyromonas asaccharolytica</i> ATCC 29943	1				1		
<i>Prevotella loescheii</i> ATCC 15930	1			1			
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25583	1			1			
<i>Bifidobacterium breve</i> ATCC 15700	1			1			
<i>Finegoldia magna</i> ATCC 29328	1			1			
<i>Peptostreptococcus anaerobius</i> ATCC 27337	1			1			

i wsp. (18) tą samą metodą wykazali działanie olejku wobec szczepów *Staphylococcus aureus* ATCC 43300, *Bacillus cereus* ATCC 14579 i *Escherichia coli* ATCC 25922. W badaniach przeprowadzonych przez Nelsona i wsp. (20) olejek w stężeniach > 2,0% był bakterio-bójczy lub hamował wzrost gronkowców z gatunku *Staphylococcus aureus* MRSA i *Staphylococcus aureus* VRE. Natomiast doświadczenia Peppeljnjak i wsp. (3) wykazały większą aktywność olejku jałowcowego na wybrane bakterie niż wobec grzybów drożdżopodobnych i dermatofitów. Przeprowadzono też badania, w których oceniono działanie przeciwdrobnoustrojowe oraz wpływ na aktywność użytych rozpuszczalników (12, 14, 19).

Wnioski

1. Wśród Gram-ujemnych bakterii największą wrażliwość na olejek jałowcowy wykazały pałeczki z rodzaju *Prevotella* i *Porphyromonas*.
2. Olejek był najmniej aktywny wobec Gram-ujemnych pałeczek z rodzaju *Bacteroides*, *Parabacteroides* i *Tannerella*.
3. Spośród Gram-dodatnich bakterii większą wrażliwość wykazały Gram-dodatnie ziarniaki niż Gram-dodatnie pałeczki.
4. Gram-dodatnie drobnoustroje okazały się bardziej wrażliwe na olejek jałowcowy w porównaniu z Gram-ujemnymi pałeczkami.

Piśmiennictwo

- Hiller K, Lüw D. *Juniperi pseudofructus*. W: Teedrogen and Phytopharmaka. Wichtl. M (red.). Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft. Stuttgart 2009.
- Sela F, Karapandzova M, Stefkov G i wsp. Chemical composition of berry essential oils from *Juniperus communis* L. (*Cupressaceae*) growing wild in Republic of Macedonia and assessment of the chemical composition in accordance to European Pharmacopeia. Maced Pharm Bull 2011; 51(1,2):43-51.
- Pepeljnjak S, Kosalec I, Kalodera Z i wsp. Antimicrobial activity of juniper berry essentials oil (*Juniperus communis* L., *Cupressaceae*). Acta Pharm 2005; 55:417-22.
- Majewska E, Kozłowska M, Kowalska D i wsp. Characterization of the essential oil from cone-berries of *Juniperus communis* L. (*Cupressaceae*). Herba Pol 2017; 63(3):48-55.
- Dahmane D, Dob T, Chelghoum C. Chemical composition of essential oils of *Juniperus communis* L. obtained by hydrodistillation and microwave-assisted hydrodistillation. J Mater Environ Sci 2015; 6(5):1253-9.
- Raal A, Kanut M, Orav A. Annual variation of yield and composition of the essential oil of common juniper (*Juniperus communis* L.) branches from Estonia. Baltic Forestry 2010; 16(1):50-6.
- Angioni A, Barra A, Russo MT i wsp. Chemical composition of the essential oils of *Juniperus* from ripe and unripe berries and leaves and their antimicrobial activity. J Agric Food Chem 2003; 51(10):3073-8.
- Chatzopoulou PS, Katsiotis ST. Chemical investigation of the leaf oil of *Juniperus communis* L. J Essent Oil Res 1993; 5:603-7.
- Marongin B, Porcedda S, Piras A i wsp. Extraction of *Juniperus communis* L. spp. Nana wild essential oil by supercritical carbon dioxide. Flavour Fragr J 2006; 21:148-54.
- Fernandez A, Cock IE. The therapeutic properties of *Juniperus communis* L.: Antioxidant capacity, bacterial growth inhibition, anticancer activity and toxicity. Pharmacogn J 2016; 8(3):273-80.
- Filipowicz N, Ochocka JR. Jałowiec pospolity *Juniperus communis* L. popularna lecznicza roślina olejkowa. Post Fitoter 2008; (1):26-31.
- Glišić SB, Milojević SZ, Dimitrijević SL i wsp. Antimicrobial activity of the essential oil and different fractions of *Juniperus communis* L. and a composition with some commercial antibiotics. J Serb Chem Sci 2007; 72(4):311-20.
- Höferi M, Stoilova I, Schmidt E i wsp. Chemical composition and antioxidant properties of juniper berry (*Juniperus communis* L.) essential oil. Action of the essential oil on the antioxidant protection of *Saccharomyces cerevisiae* model organism. Antioxidants 2014; 3:81-98.
- Filipowicz N, Kamiński M, Kurlenda J i wsp. Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components. Phytother Res 2003; 17(3):227-31.
- Consentino S, Barra A, Pisano B i wsp. Composition and antimicrobial properties of Sardinian *Juniperus* essential oils against food borne pathogens and spoilage microorganism. J Food Protect 2003; 66(7):1288-91.
- Webster D, Tascherean P, Belland RJ i wsp. Antifungal activity of medicinal plant extracts: preliminary screening studies. J Ethnopharmacol 2008; 115:140-6.
- Milojević SZ, Glišić SB, Skala DU. The batch fractionation of *Juniperus communis* L. essential oil: Experimental study, mathematical simulation and process economy. Ind Chem Engin Quart 2010; 16(2):183-91.
- Kun E. Determination of antimicrobial activity essential oils as additives to develop biologically degradable polymeric packaging. Mat Sci Engin 2012; 37(2):59-63.
- Hartman G, Coetzee JC. Two US practitioner's experience of using essential oils for wound care. J Wound Care 2002; 11(8):317-20.
- Nelson RRS. *In vitro* activities of five plant essential oils against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium*. J Antimicrob Chemother 1997; 40:305-6.

Konflikt interesów

Conflict of interest

Brak konfliktu interesów

None

otrzymano/received: 11.9.2018

zaakceptowano/accepted: 28.10.2018

Adres/address:

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