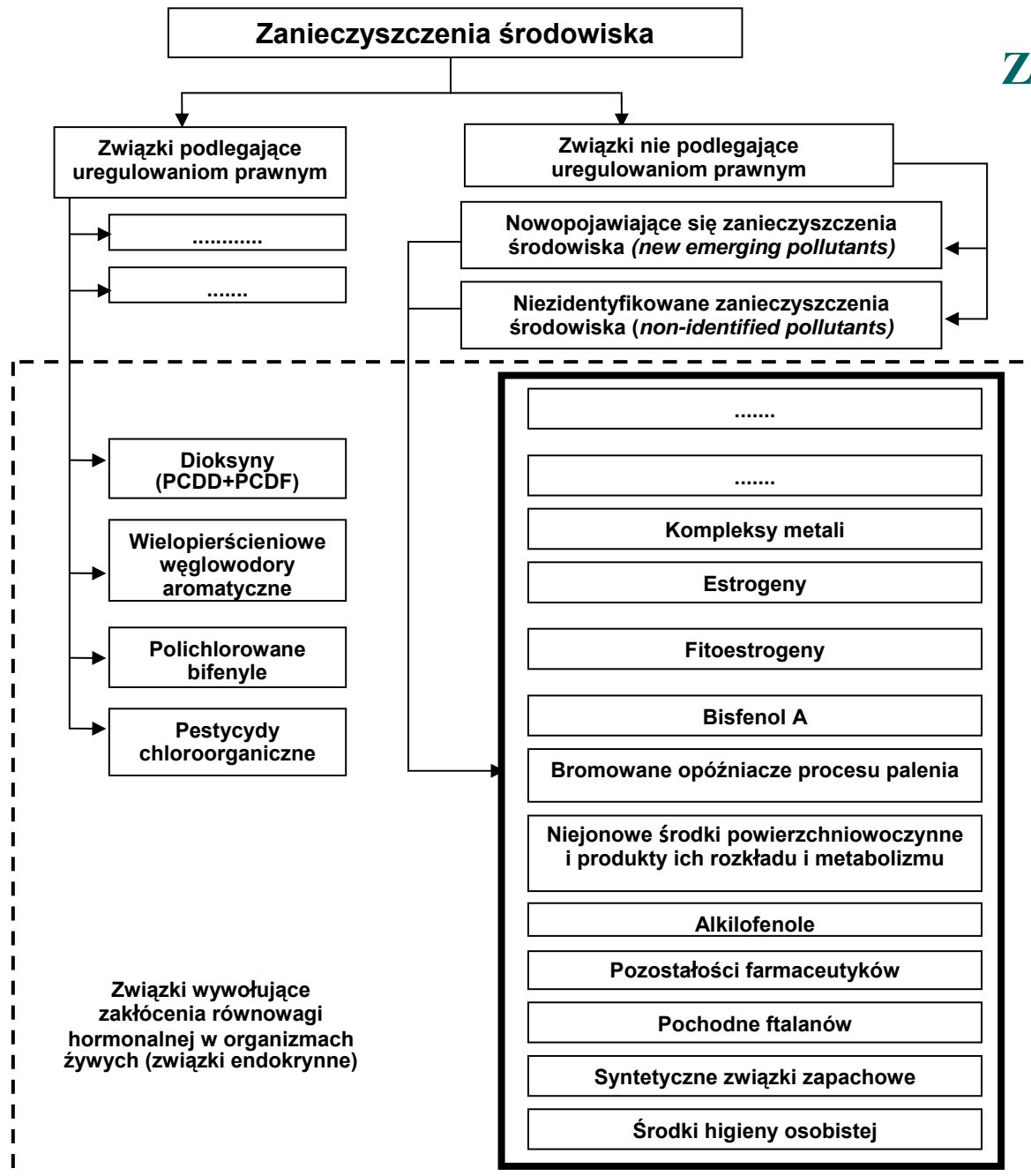




PROBLEMY ZWIĄZANE Z OZNACZANIEM ZWIĄZKÓW CZYNNYCH BIOLOGICZNIE W PRÓBKACH ŚRODOWISKOWYCH

**Jacek Namieśnik
Katedra Chemii Analitycznej
Wydział Chemiczny Politechniki Gdańskiej
Ul. G. Narutowicza 11/12
80-952 Gdańsk
Tel: (058) 347 1010
Fax: (058) 347 2694
Email: chemanal@pg.gda.pl**

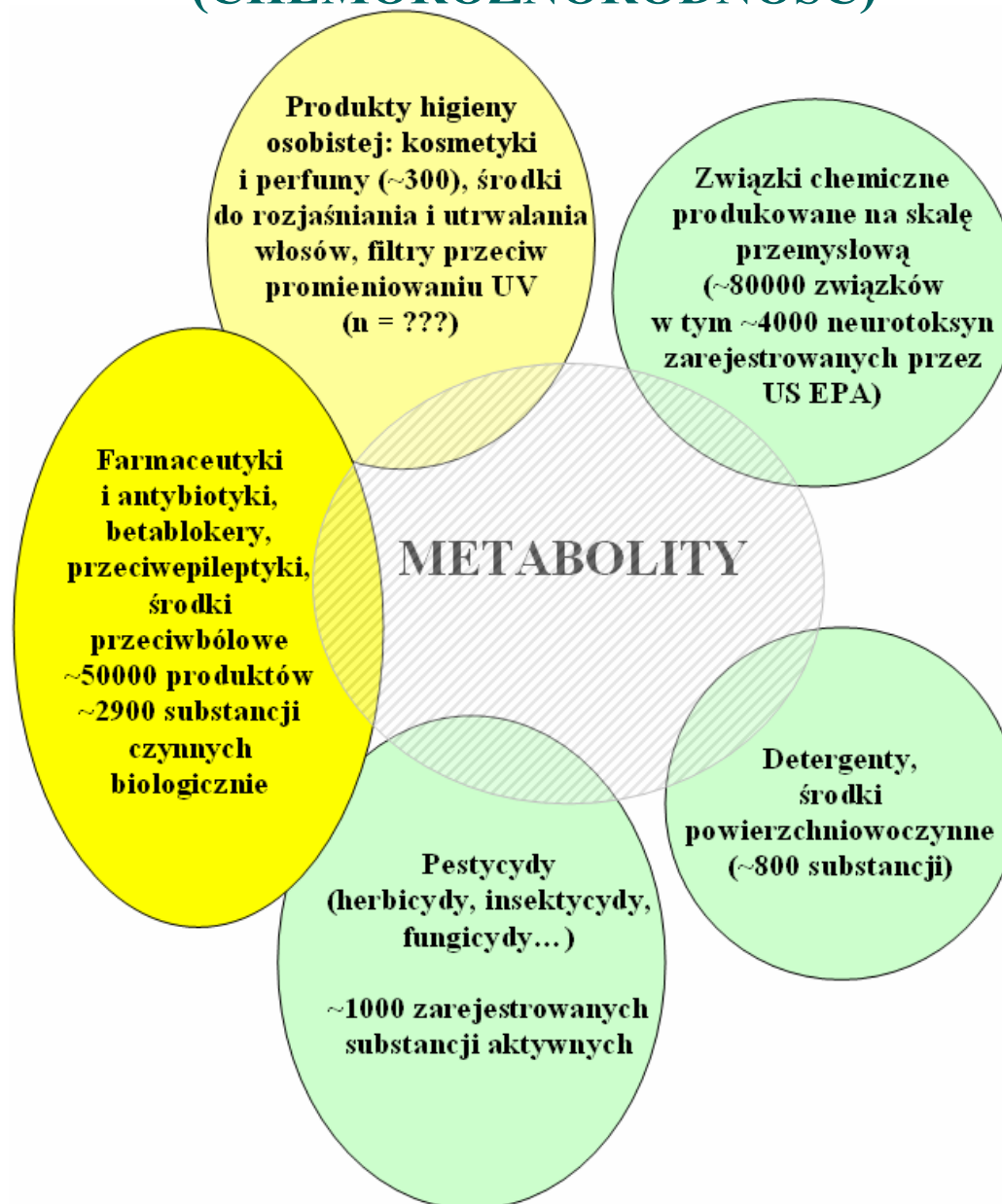
KLASYFIKACJA ZANIECZYSZCZEŃ ŚRODOWISKA



AKRONIMY W LITERATURZE ANGLOJĘZYCZNEJ

AKRONIM	PEŁNA NAZWA	
	JĘZYK ANGIELSKI	JĘZYK POLSKI
EDC's	Endocrine Disrupting Chemicals (Compounds)	Związki wywołujące naruszenie równowagi hormonalnej (związki endokrynne)
CMR	Carcinogenic, Mutagenic, Toxic to Reproduction	Związki rakotwórcze, mutagenne i stanowiące zagrożenie dla reprodukcji
PBT	Persistent, Bioaccumulative, Toxic	Trwałe związki toksyczne wykazujące zdolność do bioakumulacji
vPvB	very Persistent very Bioaccumulative	Bardzo trwałe związki wykazujące szczególnie wysoką zdolność do bioakumulacji
POP's	Persistent Organic Pollutants	Trwałe zanieczyszczenia organiczne
PPCP's	Pharmaceuticals and Personal Care Products	Farmaceutyki i środki higieny osobistej

CHEMIA ŚRODOWISKA (CHEMORÓŻNORODNOŚĆ)






WYZWANIA ZWIĄZANE Z ZANIECZYSZCZENIEM ŚRODOWISKA

- występowanie zanieczyszczeń w poszczególnych elementach środowiska w postaci złożonych mieszanin;
- brak możliwości oceny potencjalnego wpływu złożonej mieszaniny na środowisko ze względu na różnorodność strukturalną i możliwe interakcje;
- dążność do uzyskania informacji o oddziaływaniu złożonej mieszaniny na środowisko (np. w wyniku zastosowania biotestów ang. *bioassay*);
- konieczność określenia specyficznych mechanizmów wywoływania efektów toksycznych
 - ✓ zakłócenie równowagi hormonalnej
 - ✓ immunotoksyczność
 - ✓ neurotoksyczność
 - ✓ toksyczność „dioksynopodobna”

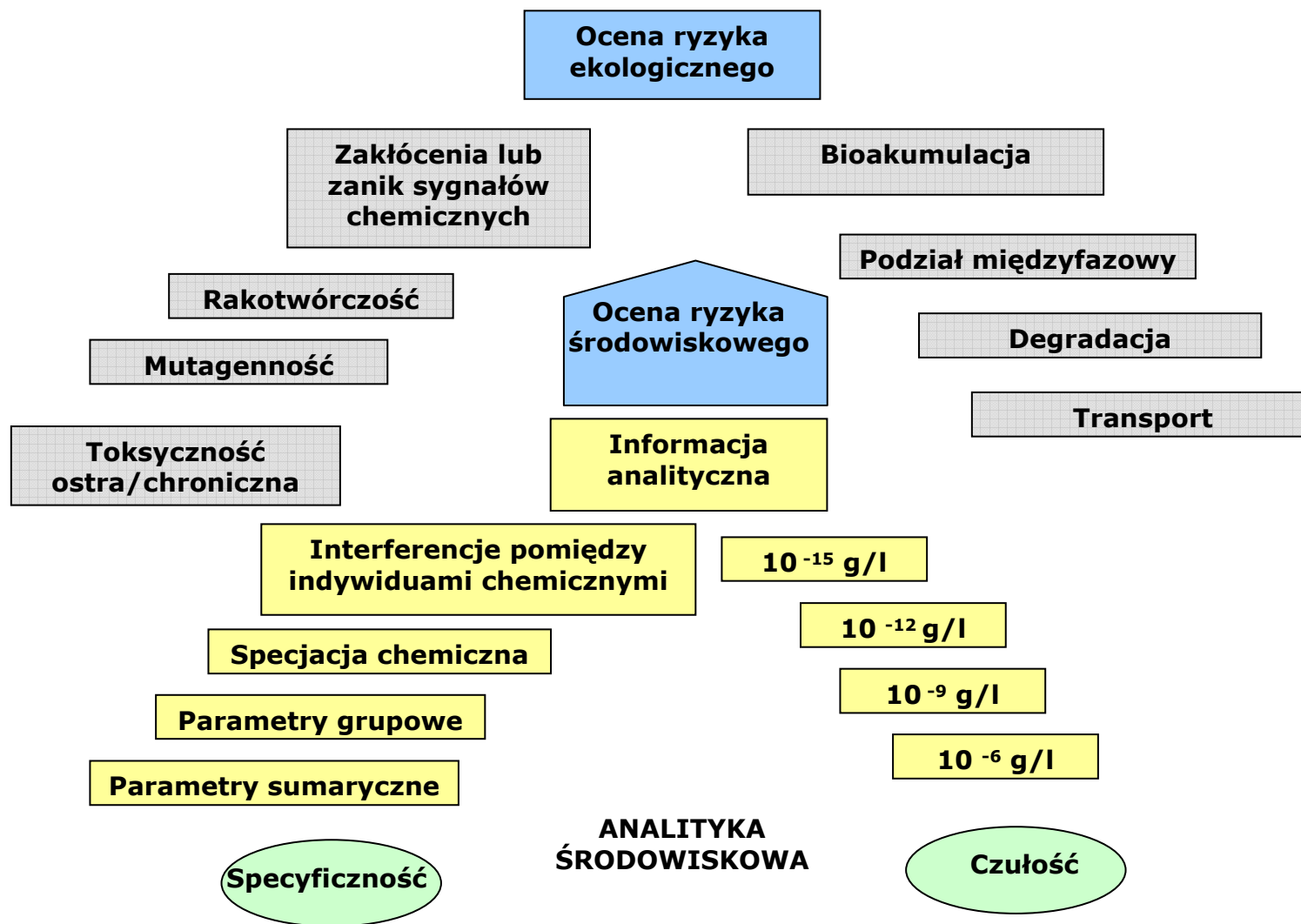
OBSZAR WYKORZYSTANIA INFORMACJI O STANIE ŚRODOWISKA

- 
- **Występowanie i poziomy stężeń poszczególnych analitów**
 - ✓ Konwencje
 - ✓ Dyrektywy
 - ✓ Badania porównawcze
 - **Badanie losu środowiskowego ksenobiotyków**
 - ✓ Względy naukowe
 - ✓ Wzrost świadomości o stanie środowiska
 - ✓ Lepsze poznanie rozkładu ksenobiotyków w poszczególnych elementach środowiska
 - **Monitoring tendencji przestrzennych i czasowych stężeń poszczególnych zanieczyszczeń**
 - **Zapewnienie danych wyjściowych i weryfikacja efektów modelowania procesów środowiskowych**
 - ✓ Wzrost świadomości o stanie środowiska
 - ✓ Lepsze poznanie rozkładu ksenobiotyków w poszczególnych elementach środowiska
 - ✓ Oszacowanie efektywności pomiarów
 - **Zapewnienie danych wyjściowych dla procesów decyzyjnych**
 - **Zapewnienie danych wyjściowych do analizy kosztów i strat**
 - **Ocena skuteczności zabiegów sozotechnicznych**

ZAMKNIĘTY SYSTEM



EKOTOKSYKOLOGIA



ROZWÓJ ANALITYKI ŚRODOWISKOWEJ

1960	1970	1980	1990	2000	2005
mg	μg	ng	pg	fg	ag

Jakie informacje są potrzebne?

Przykład:

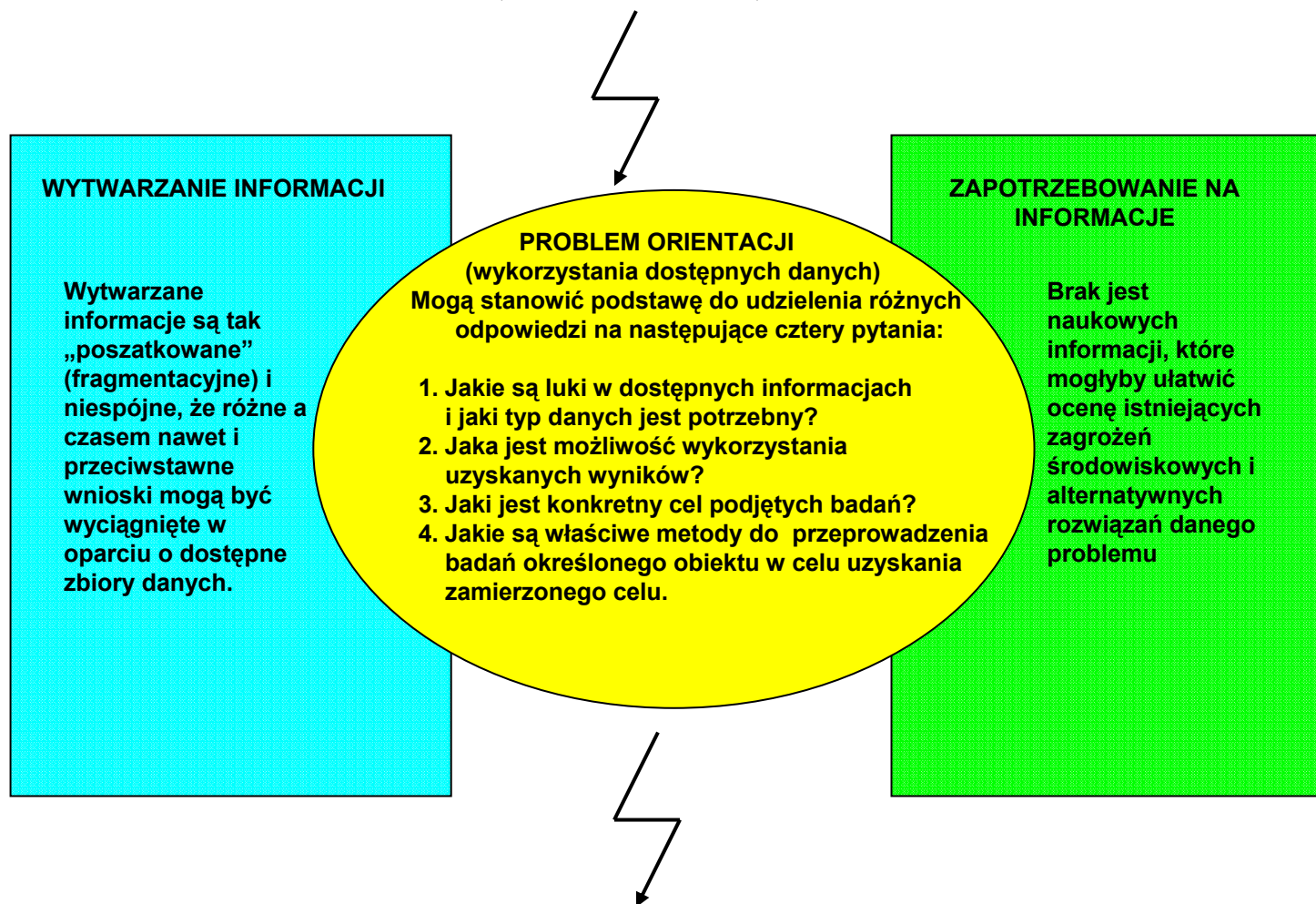
- stężenie ksenobiotyku w atmosferze: 1 pg/m³
- objętość atmosfery: 3 x 10¹⁸ m³
- całkowita ilość ksenobiotyku: 3000 kg

Na poziomie attogramów dany analit można wykryć w każdej próbce

CZY TAKA INFORMACJA JEST ISTOTNA Z PUNKTU WIDZENIA ŚRODOWISKA I/LUB EKOTOKSYKOLOGII ???

PROBLEMY Z WYKORZYSTANIEM INFORMACJI O ŚRODOWISKU

DYLEMAT Z DANymi (Data dilemma)





W JAKI SPOSÓB MONITORUJE SIĘ JAKOŚĆ ŚRODOWISKA?

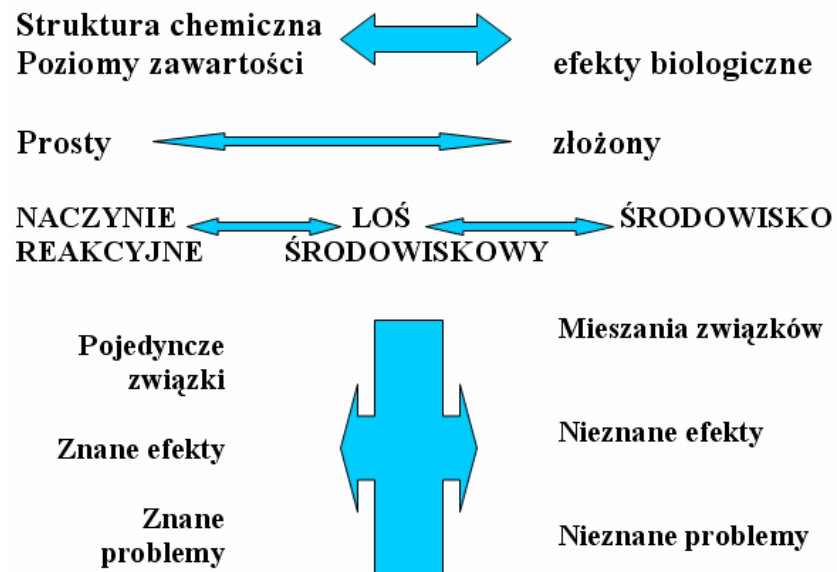
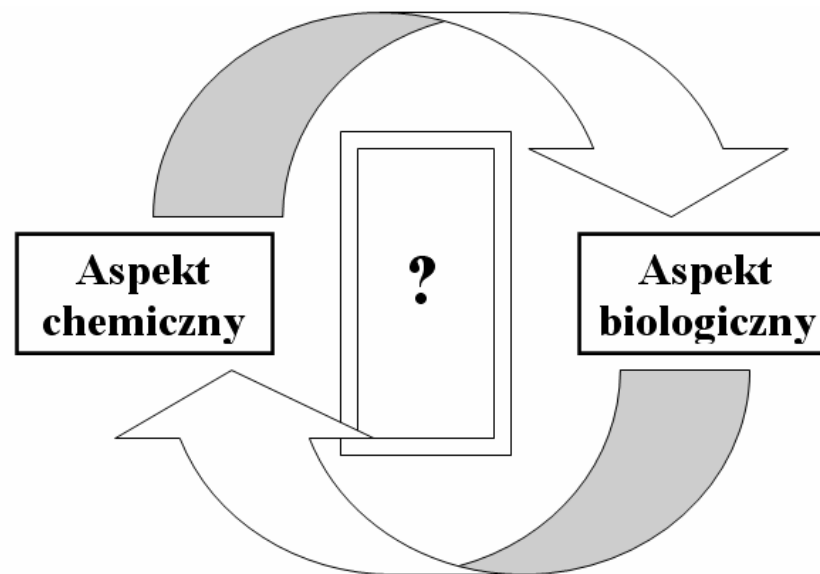
PODEJŚCIE CHEMICZNE

- **precyzyjna identyfikacja i oznaczenie zawartości poszczególnych zanieczyszczeń**

PODEJŚCIE BIOLOGICZNE

- **obserwacja wybranych przedstawicieli gatunków bioty (biowskaźniki)**
- **pomiar zawartości zanieczyszczeń w tkankach i narządach organizmów żywych (bioakumulatory)**

ZANIECZYSZCZENIE ŚRODOWISKA

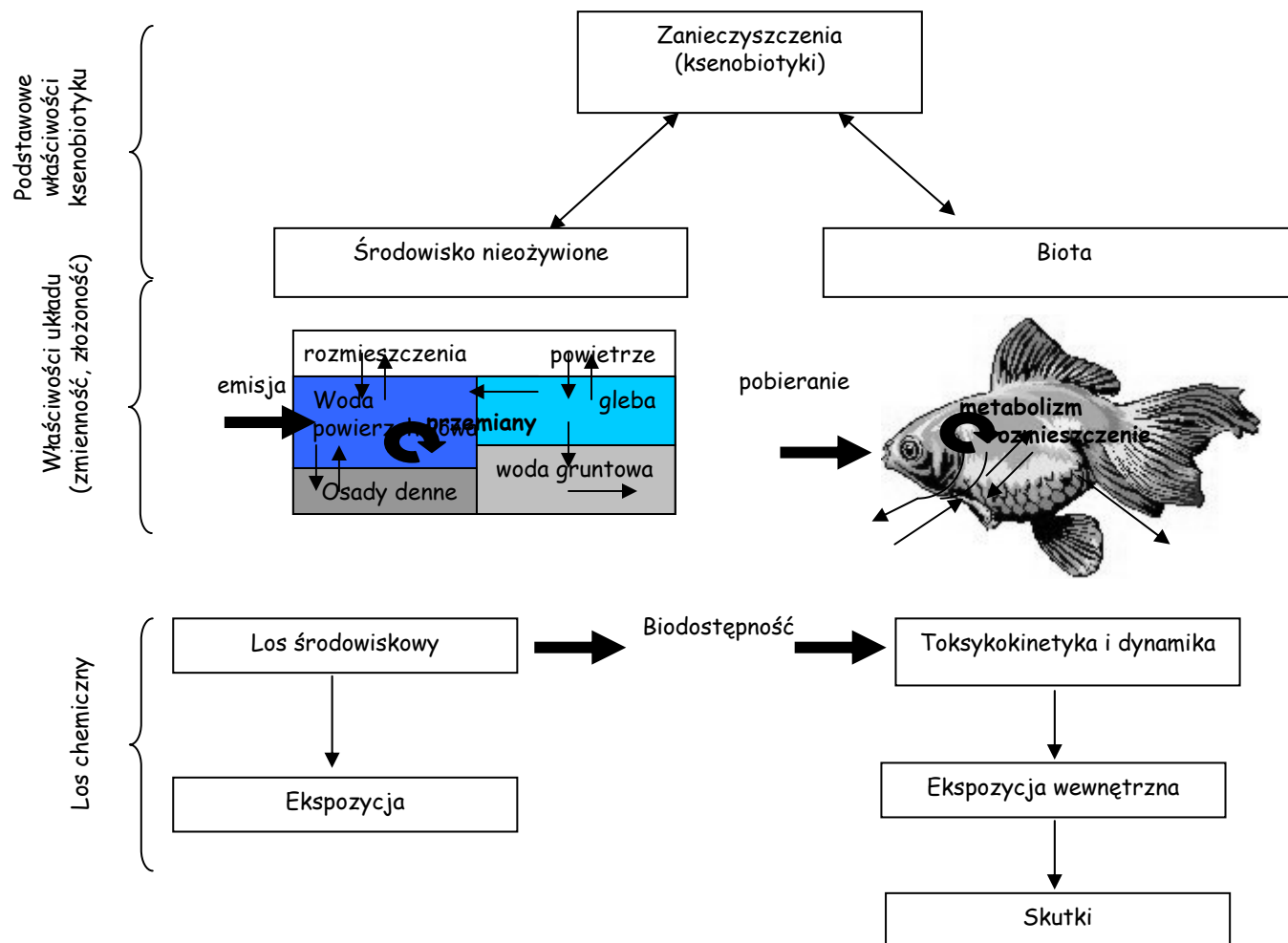


OTWARTE PYTANIA

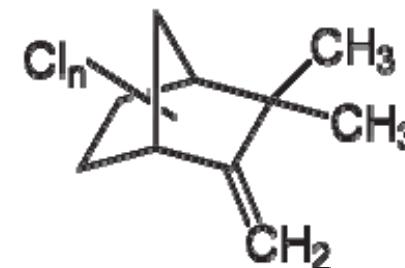


Podejście chemiczne	Podejście biologiczne
Czy są dostępne istotne informacje o zanieczyszczeniach?	Jaki jest poziom znajomości losu środowiskowego zanieczyszczeń?
Czy jest dostępna wystarczająca ilość informacji o stanie środowiska?	Czy są dostępne istotne informacje o stanie środowiska?
Czy jest możliwość właściwego wykorzystania dostępnych informacji?	Jak zostaną wykorzystane, zinterpretowane i przedstawione dostępne dane?

ODDZIAŁYWANIE ZANIECZYSZCZEŃ NA CZĘŚĆ NIEOŻYWIONĄ I OŻYWIONĄ ŚRODOWISKA



BIOWZBOGACANIE TOKSAFENU (w Arktyce Kanadyjskiej) [CAS: 800-35-2]



Element środowiska typ próbki	Stężenie [ppb] (w przeliczeniu na mokrą masę)
Powietrze	0,0007
Śnieg	0,0009- 0,002
Woda morska	0,0003
Zooplankton	3,6
Tkanka mięśniowa dorsza arktycznego	14-46
Tkanka pstrąga arktycznego	44-157
Tran z foki pręgowanej	130-480
Tran z beługi	1380-5780
Tran z narwala	2440-9160

L.O. Reiersen; Local and Transboundary Pollutants, The Arctic: Environment, Preople, Policy.
Harwood Acad. Publ., Amsterdam, 2000, str. 585



OGRANICZENIA PODEJŚCIA CHEMICZNEGO W MONITORINGU ZANIECZYSZCZEŃ CZĘŚCI ABIOTYCZNEJ ŚRODOWISKA

- **konieczność wykorzystania złożonych procedur analitycznych i skomplikowanych przyrządów kontrolno-pomiarowych**
- **brak informacji o wpływie zanieczyszczeń na organizmy żywe**
- **duży koszt prowadzonych badań**
- **uzyskiwanie jedynie wyrywkowego obrazu stanu środowiska bez uwzględnienia dynamiki zmian (ze względu na koszty)**
- **powierzchowna (często błędna) ocena biodostępności ksenobiotyków**



OGRANICZENIA PODEJŚCIA CHEMICZNEGO W MONITORINGU ZANIECZYSZCZEŃ CZĘŚCI BIOTYCZNEJ ŚRODOWISKA

- **wyniki pomiarów nie odzwierciedlają zjawiska pojemności środowiska w stosunku do zanieczyszczeń**
- **brak możliwości wykrycia i oznaczenia niektórych składników występujących w środowisku w śladowych ilościach**
- **praco- i czasochłonność realizacji zadań analitycznych**
- **wykrycie ksenobiotyków nie jest jednoznaczne ze stwierdzeniem toksyczności**
- **brak informacji o znaczeniu toksykologicznym bardzo małych dawek ksenobiotyków**



ZWIĄZKI ENDOKRYNNE (*ENDOCRINE DISRUPTING COMPOUNDS –EDC'S*)

An exogenous agent that interfaces with synthesis, secretion, transport, binding, action or elimination of natural hormones in the body that is responsible for the maintenance of homeostasis, reproduction or behavior.

U.S. EPA Special Report on Environmental Endocrine Disruption: An effect assessment and analysis. EPA/630/R-96/012 (1997)

Czynnik zewnętrzny (pozaustrojowy), który wpływa na:

- Syntezę,
- Wydzielanie,
- Transport,
- Wiązanie,
- Działanie,
- Eliminacje

naturalnych hormonów w organizmie, które są odpowiedzialne za utrzymanie homeostazy, zachowanie organizmu i jego reprodukcję.

POTENCJAŁ ENDOKRYNNY

- Potencjał endokrynnny różnych ksenobiotyków może być porównywany poprzez określenie stężenia równoważnikowego endokrynnności (*ang. Estrogen equivalent concentration -EEQ*)
- $EEQ_i = C_i \cdot EEF_i$
- $EEQ_t = \sum EEQ_i$
- gdzie:
- C_i – stężenie danego ksenobiotyku
- EEF – współczynnik endokrynnności
- Wartości liczbowe współczynnika EEF wyrażają względną endokrynnność danego ksenobiotyku w stosunku do endokrynnności **ESTRADIOLU** lub **17 β -ESTRADIOLU**.
- Właściwości endokrynnne są określane za pomocą różnych biotestów (**ER-CALUX**, **YES**, **E-screen transgenic zebrafish**).



JAK JEST LICZBA ZWIĄZKÓW WYKAZUJĄCYCH WŁAŚCIWOŚCI ENDOKRYNNE?

Znanych jest około 150 substancji chemicznych zaliczanych do grupy EDC

➤ **związki endokrynne pochodzenia naturalnego:**

- FITOESTROGENY

➤ **związki syntetyczne:**

**- FARMACEUTYKI (środki antykoncepcyjne,
syntetyczne sterydy...)**



ZWIĄZKI WYKAZUJĄCE WŁAŚCIWOŚCI ENDOKRYNNE (estrogen - like activity)

Szerokie spektrum związków chemicznych – KSENOESTROGENY

- **Związki chlorowcoorganiczne (DDT, PCB...)**
- **Metale ciężki (As, Cd...)**
- **Bisfenol A**
- **Nonylofenole**

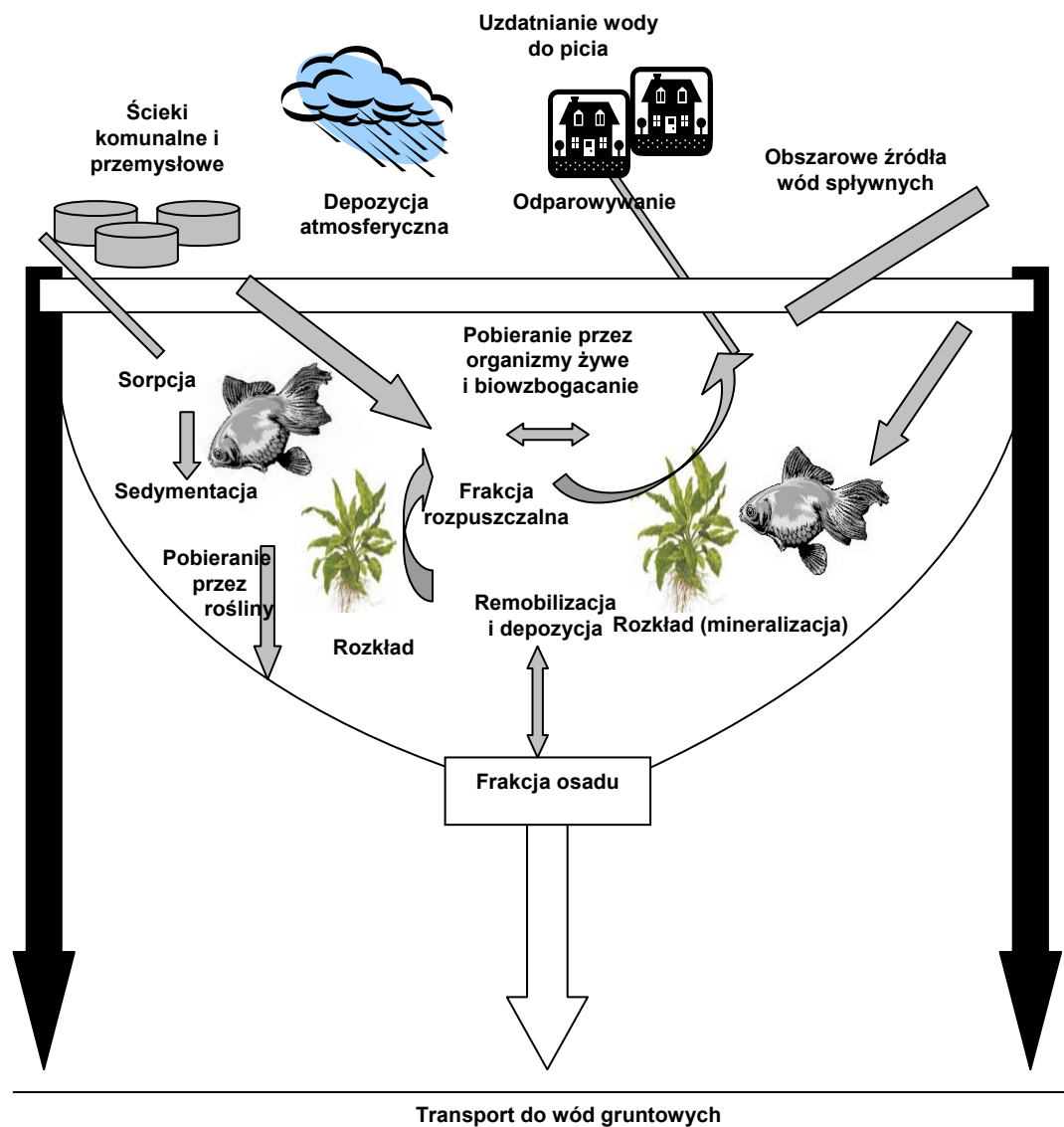
J. Węsiorska - Gądek, Ecohydrol. Hydrobiol., **6**, 125 (2006)



EFEKTY BIOLOGICZNE DZIAŁANIA DIOKSYN (PCDD+PCDF)

- **Efekty hormonalne (działanie endokryne),**
- **Indukcja enzymu (cytochrom P4501A),**
- **Działanie rakotwórcze,**
- **Zakłócenia w reprodukcji.**

LOS ŚRODOWISKOWY ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH



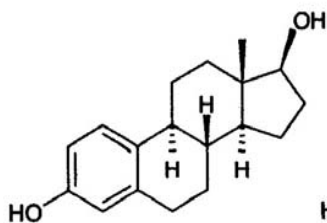
Ch. G. Campbell, S. E. Borglin,
F. B. Green, A. Grayson, E.
Wozniak, W. T. Stringfellow,
Chemosphere, **65**, 1265-1280
(2006)

PRZYKŁADY ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH

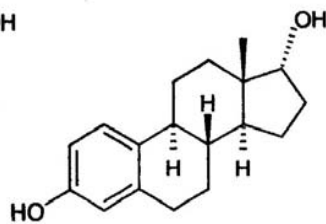
ZWIĄZEK	SKRÓT / AKRONIM	UWAGI
17 β -estradiol i 17 α -estradiol	B-E2 i α -E2	Estrogeny naturalne
Estron	E1	Estrogen, metabolit E2
Estriol	E3	Estrogen naturalny
17 α -etynyloestradiol	EE2	Syntetyczny estrogen ogólnie stosowany w łączonej profilaktyce antykoncepcyjnej
Testosteron	Test	Naturalny androgen
Progesteron	Pg	Naturalny androgen
Dehydroepiandrosteron	DHEA	Androgen, precursor hormonów płciowych
Lewonorgestrol	LNor	Syntetyczny progestagen powszechnie stosowany w antykoncepcji z zastosowaniem wyłącznie progestagenów
Noretyndron	Nore	Syntetyczny progestagen powszechnie stosowany w antykoncepcji z zastosowaniem wyłącznie progestagenów
Kortyzon	Cor	Glukokortykoid – syntetyczny homolog kortyzonu
Prednizon	Pd	Glukokortykoid – syntetyczny homolog kortyzonu

BUDOWA STRUKTURALNA NATURALNYCH I SYNTETYCZNYCH ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH

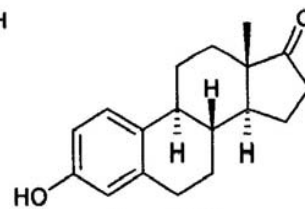
Naturalne



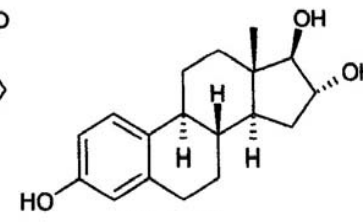
17β-estradiol (E2)
MM 272.37



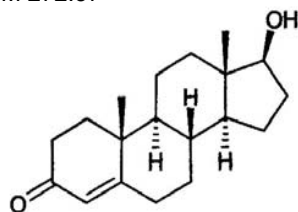
17α-estradiol (α-E2)
MM 272.37



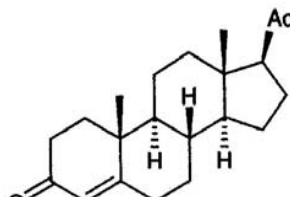
Estron (E1)
MM 270.36



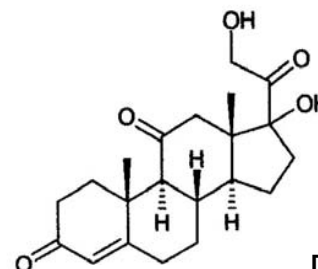
Estriol (E3)
MM 288.37



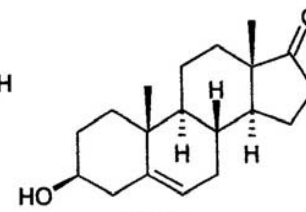
**Testosteron
(Test)**
MM 288.4



**Progesteron
(Pg)**
MM 314.45

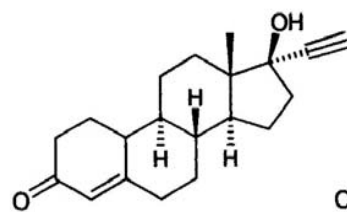


Kortyzon (Cor)
MM 360.5

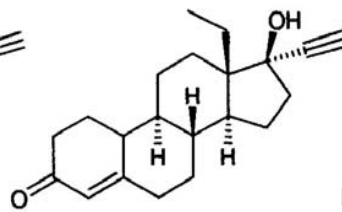


Dehydroepiandrosteron (DHEA)
MM 288.42

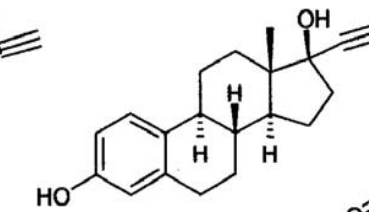
Syntetyczne



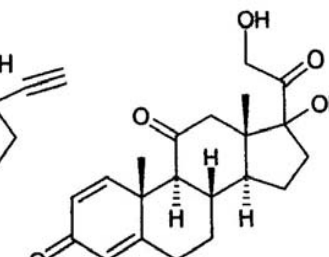
Noretyndron (Nore)
MM 298.41



**Lewonorgestrol
(LNor)**
MM 312.44



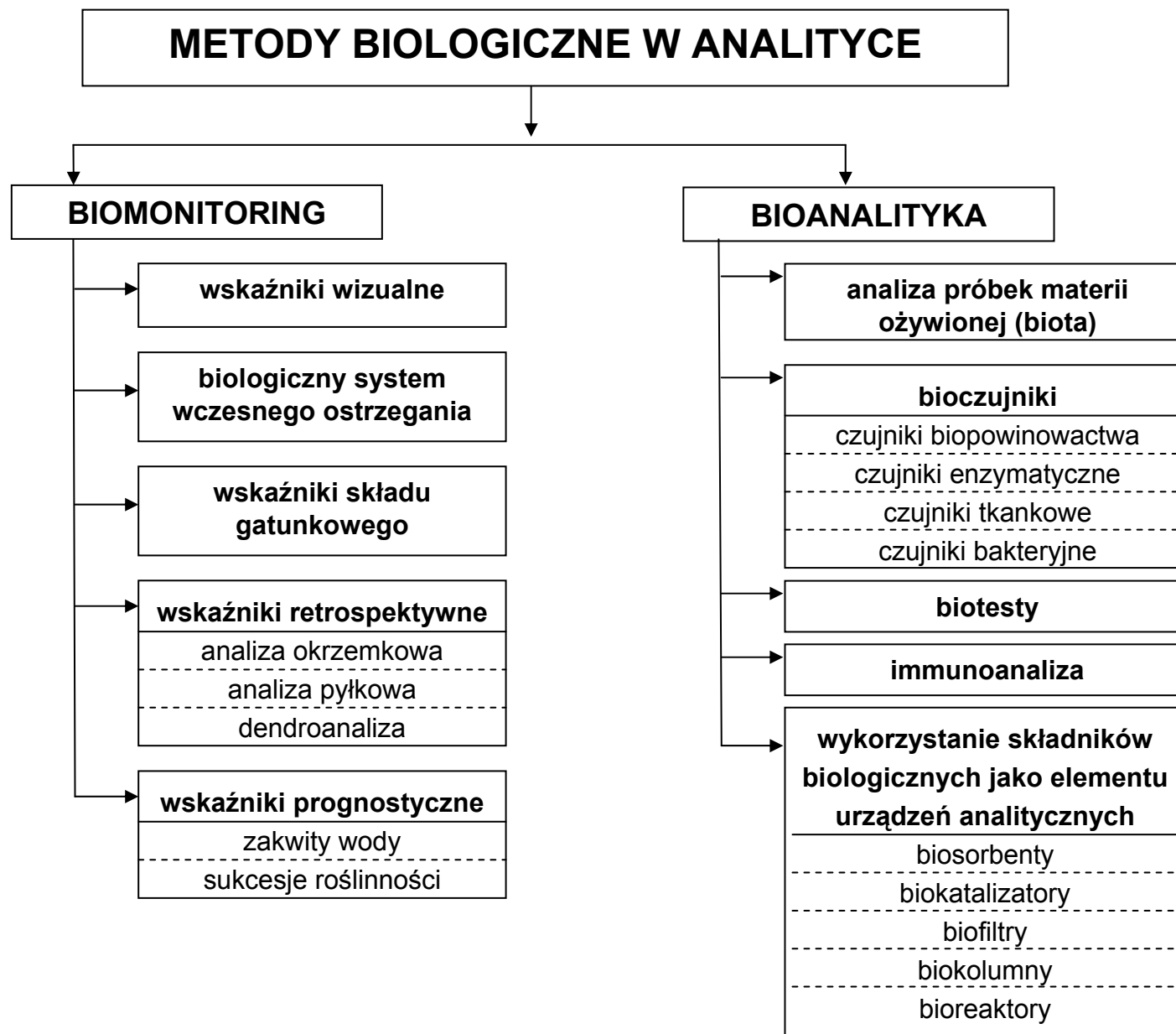
17α-etyloestradiol (EE2)
MM 296.39



Prednizon (Pd)
MM 358.43

E. Vulliet, J. B. Baugros, M. M. Flament-Waton, M. F. Grenier-Loustalot, *Anal. Bioanal. Chem.*, **387**, 2143-2151 (2007)

KLASYFIKACJA BIOLOGICZNYCH METOD ANALIZY I MONITORINGU



PRZYKŁADY ORGANIZMÓW WYKORZYSTYWANYCH JAKO WSKAŹNIKI EKSPOZYCJI NA ZWIĄZKI ENDOKRYNNE

GATUNEK	NAZWA ZWYCZAJOWA	ZMIANY WYWOŁYWANE PRZEZ ZWIĄZKI
<i>Rana pipiens</i>	Żaba lamparcia	Anomalie gonad
<i>Chrysemys picta</i>	Żółw malowany	Indukcja witellogeniny
<i>Oncorhynchus mykiss</i>	Pstrąg tęczowy	Zakłócenia w rozrodzie, indukcja witellogeniny
<i>Primephales promelas</i>	Ciernik promienisty	Anomalie gonad, zakłócenia w rozrodzie, indukcja witellogeniny
<i>Cyprinodon variegates</i>	Karpieńiec zwyczajny	Indukcja witellogeniny
<i>Danio rerio</i> <i>Brachydanio rerio</i>	Danio pręgowany	Anomalie gonad, zakłócenia w rozwoju fizjologicznym, indukcja witellogeniny i lucyferyny
<i>Oryzias latipes</i>	Ryżówka japońska	Anomalie gonad, Zakłócenia w reprodukcji
<i>Platichthys flesus</i>	Stornia (flądra)	Anomalie gonad, zakłócenia w rozwoju fizjologicznym, indukcja witellogeniny
<i>Salmo salar</i>	Łosoś atlantycki	Zmiany białek warstwy promienistej, indukcja witellogeniny
<i>Haliaeetus leucocephala</i>	Bielik amerykański	Skutki teratogenne i zakłócenia w reprodukcji
<i>Coturnix japonica</i> <i>Colinus virginianus</i>	Przepiórka japońska Przepiórka błękitna	Zmiany zachowań seksualnych, zakłócenia w rozwoju embrionu, zmiany w grubości skorupki jaj
<i>Gallus domesticus</i>	Kura domowa	Zakłócenia w rozwoju embrionu, zmiany w grubości skorupki jaj
<i>Daphnia magna</i>	Rozwielitka	Zakłócenia fizjologiczne i biochemiczne
<i>Tisbe battagliai</i>	Skorupiak morski	Zmiany w płodności i zakłócenia w szybkości rozwoju

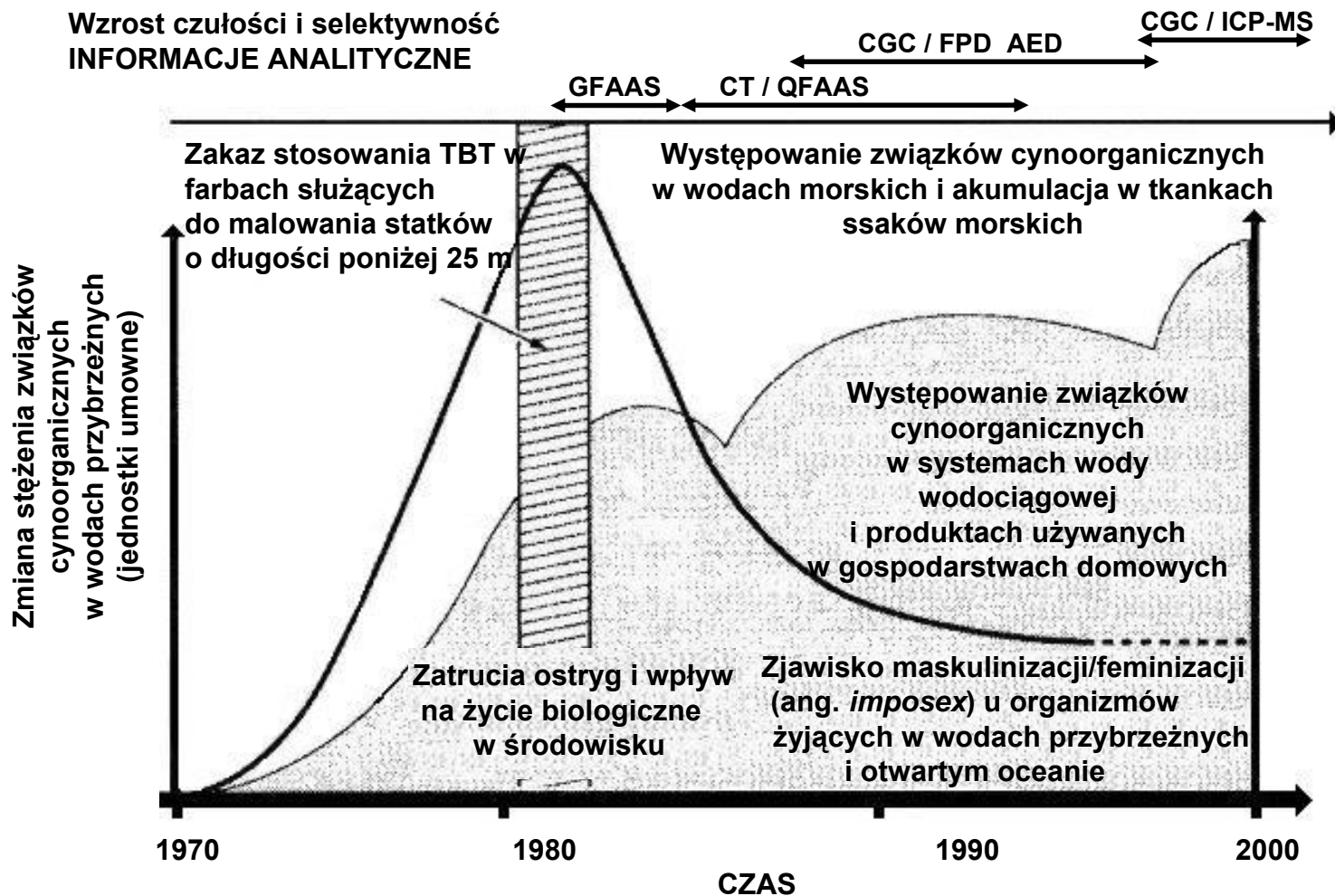
PRZYKŁADY NIEKOMÓRKOWYCH BIOTESTÓW I BIOCUJNIKÓW WYKORZYSTYWANYCH DO WYKRYWANIA ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH

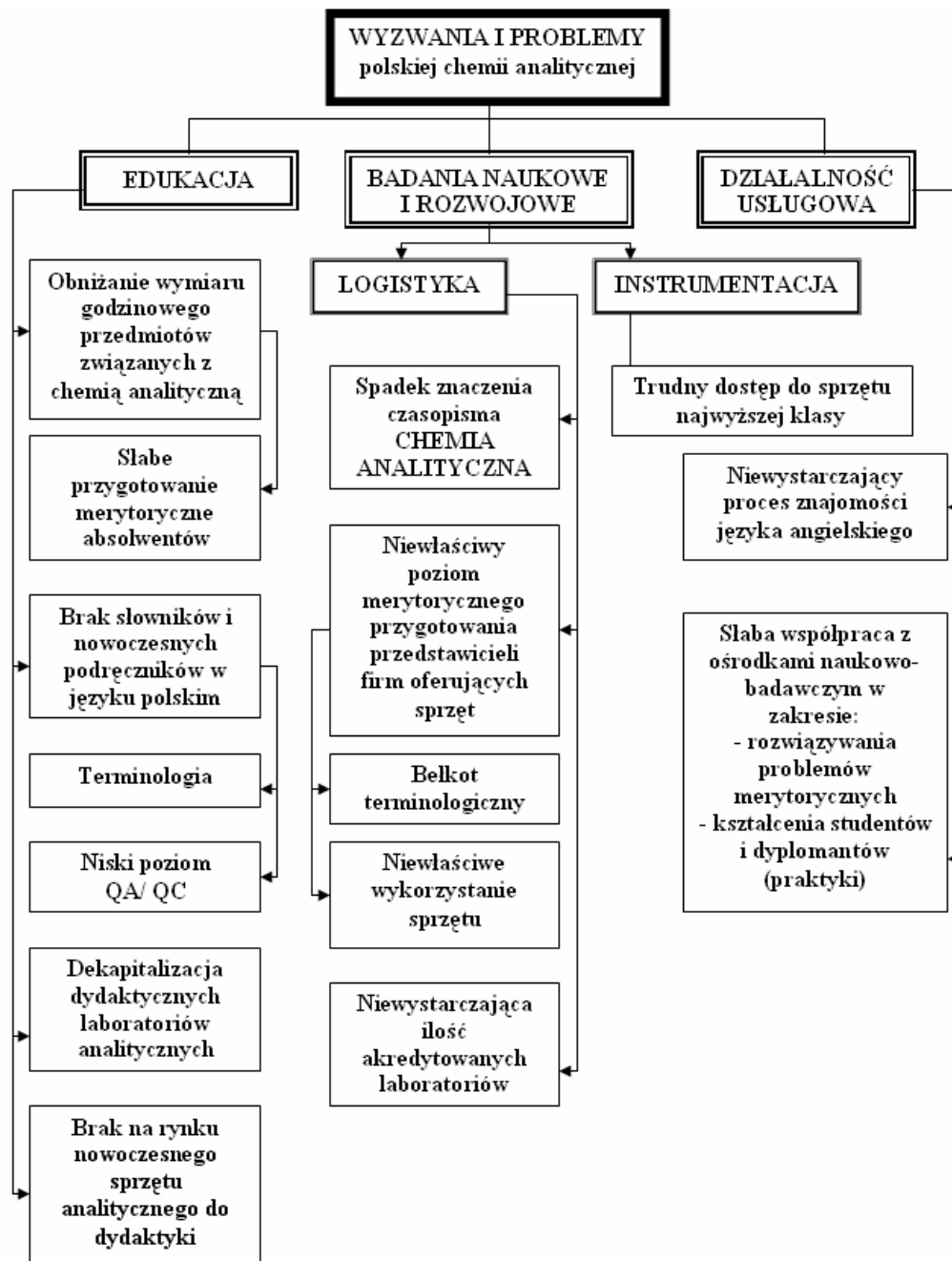
NAZWA BIOTESTU	MIERZONY SYGNAŁ	DETEKTOR
ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assays)	Natężenie promieniowania świetlnego	Spektrofotometr
ELRA (Enzyme-linked receptor assay)	Natężenie promieniowania świetlnego	Spektrofotometr
Endotect™	Fluorescencja	Fluorometr
RIANA (River analysis)	Fluorescencja	Fluorometr
Biacore™	Rezonans powierzchni plazmonu	Detekcja promieniowania laserowego Multimetr
BioczuJNIKI (elektrochemiczne)		
SCCoR (Single cell coactivator recruitment)	Wskaźnik fluorescencyjny	Fluorometr
RBA (Microarray relative binding assay)	Wskaźnik fluorescencyjny	Fluorometr

PRZYKŁADY TESTÓW KOMÓRKOWYCH PRZEZNACZONYCH DO WYKRYWANIA ZWIĄZKÓW ENDOKRYNNYCH

Nazwa zwyczajowa (handlowa)	Rodzaj komórki	Efekt wywoływany przez związki endokryne
E-SCREEN	MCF-7 komórki raka piersi	prolifерacja
Yeast Estrogen Screen (YES) - łącznie z wariantami LYES i BLYES	Różnorakie (<i>Sachcaromyces spp.</i> , <i>Cryptococcus spp.</i> , <i>Candida spp.</i>)	luminescencja kolorymetria
Analiza ER-lucyferazy z komórkami HEK 293	Ludzka nerka embrionalna (HEK)	luminescencja
NA	<i>E. coli</i>	luminescencja
Ekspresja czułej na estrogen lucyferazy chemicznie aktywowanej (ER-CALUS®)	T47D Komórka raka gruczołu piersiowego	luminescencja
IR-bio-amplifikacja	Komórki ssaków	Funkcja komórkowa

TENDENCJE ZMIAN STĘŻENIA ZWIĄZKÓW CYNOORGANICZNYCH W ŚRODOWISKU I WZROST ŚWIADOMOŚCI O ICH WPŁYWIE NA ORGANIZMY ŻYWE





TERMINOLOGIA ANALITYCZNA – PIĘTA ACHILLESOWA POLSKIEJ ANALITYKI

Kto odpowiedzialny?

- **nauczyciele akademicy → dwa języki:**
 - **OFICJALNY**
 - **ŻARGON** (*bo podobno łatwiej i szybciej się można porozumieć w laboratorium*)

- **marketing firm oferujących odczynniki, wyposażenie i sprzęt**
 - **niski poziom wiedzy fachowej przedstawicieli**
 - **bełkot w informatorach i ulotkach informacyjnych**

- **brak słowników analitycznych**

PRZYKŁADY

- **koncentracja - stężenie**
- **ekotoksykant - trucizna środowiskowa (ekotoksyna)**
- **materiały referencyjne – materiały odniesienia**
- **kartridż z sorbentem – pojemnik (pułapka sorpcyjna)**
- **próg (limit) detekcji (wykrywalności) – granica wykrywalności (oznaczalności)**
- **impakt zanieczyszczeń – oddziaływanie zanieczyszczeń**
- **odzywka detektora – odpowiedź detektora**
- **kompartmentacja analitu – rozmieszczenie analitu**

PRZYKŁADY

- **DATA MINING – Techniki wydobywania (dodatkowych) danych (informacji)**
- **Na seminaria poświęcone ZASTOSOWANIU STATYSTYKI I DATA MINING co roku zaprasza firma reprezentująca koncern o zasięgu globalnym oferująca programy statystyczne**
- **NIE POLECAM TYCH SEMINARIÓW!**



ZAANGAŻOWANIE CZASOPISMA „ANALITYKA”

- forum dyskusyjne:
www.malamut.pl/analitika.htm
(zakładka język analitika)
- opracowanie TERMINOLOGIA –
PIĘTA ACHILLESOWA ANALITYKÓW



PUBLIKACJE

POŚWIĘCONE PROBLEMATYCE POZOSTAŁOŚCI ZWIĄZKÓW CZYNNYCH BIOLOGICZNIE W ŚRODOWISKU

- Kot-Wasik A., Dębska J., Namieśnik J., Analytical techniques in studies of the environmental fate of pharmaceuticals and person-care products, *Trends Anal. Chem.*, **26**, 557-568 (2007)
- Wilga J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Comparison of extraction techniques of robenidine from poultry feed samples, *Talanta*, **73**, 812-819 (2007)
- Kot-Wasik A., Dębska J., Wasik A., Namieśnik J., Determination of non-steroidal anti-inflammatory drugs in natural waters using off-line and on-line SPE followed by LC coupled with DAD-MS, *Chromatographia*, **64**, 13-21(2006)
- Dąbrowska D., Kot-Wasik A., Namieśnik J. Pathways and analytical tools in degradation studies of organic pollutants. *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **35**, 117-133 (2005)
- Dębska J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Determination of nonsteroidal antiinflammatory drug in water samples using liquid chromatography coupled with diode-array detector and mass spectrometry, *J. Sep. Sci.*, **28**, 2419-2426 (2005)
- Wilga J., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Studies of human and veterinary drugs' fate in environmental solid samples-analytical problems, *J. Chromatogr Sci.*, **46**, 601-608 (2008)
- Briciu R., Kot-Wasik A., Namieśnik J., Analytical challenges and recent advances in the determination of estrogens in water environment, *J. Chromatogr Sci.*, w druku
- Kudłak B., Namieśnik J., Environmental fate of endocrine disrupting compounds - analytical problems and challenges, *Crit. Rev. Anal. Chem.*, **38**, 242-258 (2008)

GRANT BADAWCZO-ROZWOJOWY

Nowe standardowe procedury analityczne przeznaczone do badania poziomu zanieczyszczenia ekosystemów wodnych przez ksenobiotyki należące do grupy farmaceutyków i związków endokrynych na okres: 2007-2009

UDZIAŁOWCY:

- Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie (kierownik: prof. I. Wojnowska-Baryła)
- Politechnika Śląska (kierownik: prof. I. Baranowska)
- Uniwersytet im. Adama Mickiewicza (kierownik: prof. J. Nawrocki)
- Uniwersytet Opolski (kierownik: prof. P. Wieczorek)
- Uniwersytet Mikołaja Kopernika (kierownik: prof. B. Buszewski)
- Politechnika Warszawska (Kierownik: prof. M. Jarosz)
- Politechnika Gdańska (Kierownik: prof. J. Namieśnik)



KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ

[http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Analityczna/
analit.html](http://www.pg.gda.pl/chem/Katedry/Analityczna/analit.html)

Lista publikacji

Wykłady prezentowane w czasie konferencji

Kursy i szkolenia



KURSY I SZKOLENIA

Kursy indywidualne "Na zamówienie"

Wysokosprawna chromatografia cieczowa

Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa - poziom podstawowy

Wysokosprawna Chromatografia Cieczowa - poziom zaawansowany

Chromatografia Gazowa - poziom podstawowy

Aspekty praktyczne wykorzystania Chromatografii Gazowej

Przygotowanie próbek do analizy

ABC techniki SPE

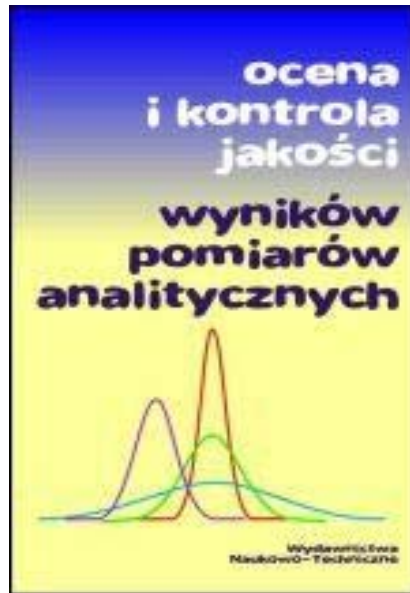
Technika HPLC w analizie żywności

Techniki łączone

Kurs Kontrola i jakość wyników pomiarów analitycznych

Biotesty w ocenie zanieczyszczenia środowiska

Ocena i kontrola jakości wyników pomiarów analitycznych



Praca zbiorowa pod. red.
P. Konieczki i J. Namieśnika

ISBN: 978-83-204-3255-8

Quality Assurance and Quality Control in the Analytical Chemical Laboratory: A Practical Approach

Piotr Konieczka *Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland*

Jacek Namiesnik *Gdansk University of Technology, Gdansk, Poland*

Series: Analytical Chemistry

**Cover
Available
Soon**



Parthenon Publishing

List Price: £67.99
Cat. #: 82701
ISBN: 9781420082708
ISBN 10: 1420082701
Publication Date: 1/15/2009
Number of Pages: 304
Availability: In Stock



CRC Press

Add To Cart

**Nowe opracowanie
(w języku angielskim)
będzie wyposażone w CD
z arkuszami kalkulacyjnymi.**

KATEDRA CHEMII ANALITYCZNEJ





Dziękuję za uwagę!