

[Akceptuję](#)

W ramach naszej witryny stosujemy pliki cookies w celu świadczenia państwu usług na najwyższym poziomie, w tym w sposób dostosowany do indywidualnych potrzeb. Korzystanie z witryny bez zmiany ustawień dotyczących cookies oznacza, że będą one zamieszczone w Państwa urządzeniu końcowym. Możecie Państwo dokonać w każdym czasie zmiany ustawień dotyczących cookies. Więcej szczegółów w naszej [Polityce Prywatności](#)

[Portal](#) [Informacje](#) [Katalog firm](#) [Praca](#) [Szkolenia](#) [Wydarzenia](#) [Porównania międzylaboratoryjne](#)
[Kontakt](#)



[Laboratoria](#)
[.net](#)
[Innowacje](#)
[Nauka](#)
[Technologie](#)

[Logowanie](#) [Rejestracja](#) [pl](#)

Newsletter

zapisz się



- [Nowe technologie](#)
- [Felieton](#)
- [Tygodnik "Nature"](#)
- [Edukacja](#)
- [Artykuły](#)
- [Przemysł](#)

[Strona główna](#) > [Artykuły](#)

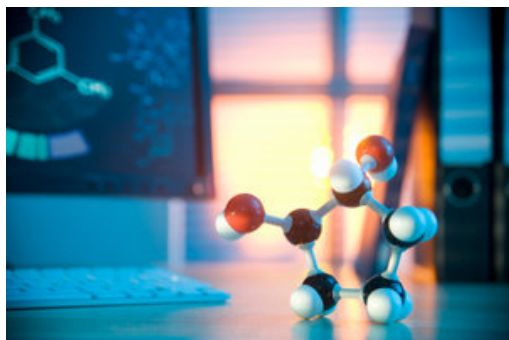
Główne techniki badawcze stosowane w proteomice

STRESZCZENIE

Przed powstałą niecałe 20 lat temu proteomiką stoi ogromne wyzwanie – opisać cały ludzki proteom, czyli scharakteryzować wszystkie białka występujące w organizmie człowieka na przestrzeni jego życia. Zadanie to, o wiele bardziej skomplikowane niż poznanie ludzkiego genomu, wymaga zastosowania efektywnych technik pozwalających na porównanie złożonych mieszanin białek oraz ilościową i jakościową ocenę ich składu. Do głównych metod stosowanych w proteomice należą elektroforeza dwuwymiarowa oraz spektrometria mas. Dzięki zastosowaniu technik proteomicznych w różnych konfiguracjach i w połączeniu z nowoczesnymi bazami danych możliwa jest analiza profili

białkowych w różnych stanach patologicznych organizmów.

SŁOWA KLUCZOWE: *Proteomika, proteom, elektroforeza, spektrometria mas, oznaczanie białek, chromatografia, masowy odcisk palca.*



WSTĘP

Dzięki projektowi poznania ludzkiego genomu naukowcom udało się zsekwencjonować wszystkie geny występujące w ludzkim DNA. Uważano, że wiedza ta pozwoli zrozumieć funkcjonowanie organizmu i otworzy przed człowiekiem nieograniczone możliwości. Jednakże okazało się, że poznanie samego genomu dostarcza jedynie informacji o białkach jakie koduje, a nie mówi niczego o modyfikacjach jakim ulegają, funkcjach jakie pełnią i w oddziaływaniach w jakich uczestniczą, przez co mechanizmy działania komórek, organów i całego organizmu nadal pozostają tajemnicą. Aby ją odkryć naukowcy podjęli się badań nad poznaniem ludzkiego proteomu (z ang. PROTEin complement of the genOME), czyli wszystkich białek pojawiających się w organizmie w ciągu całego jego życia. Dyscypliną, która się tym zajmuje jest młoda i szybko rozwijająca się dziedzina naukowa nazwana proteomiką. O ile poznanie genomu, mimo że żmudne i długotrwałe, było dosyć prostym zadaniem, o tyle poznawanie proteomu jest znacznie bardziej skomplikowane. Przede wszystkim genom jest statyczny a proteom dynamiczny. Liczba genów występująca w ludzkim organizmie jest stała i szacuję się, że wynosi ok. 30-50 tys., natomiast liczba i rodzaj białek zmieniają się w zależności od stanu fizjologicznego organizmu, jego fazy rozwoju oraz warunków środowiska. Ponad to liczba białek znacznie przewyższa liczbę genów. Obecnie ocenia się, że w ludzkim organizmie jest ich ok. 400-500 tys., czyli prawie dziesięć razy tyle co genów. Wiąże się to ze zjawiskiem alternatywnego splicingu oraz modyfikacjami potranslacyjnymi zachodzącymi w trakcie ekspresji genów, co prowadzi do powstania białek o odmiennej budowie. Okazuje się, że z jednego genu może powstać nawet kilkadziesiąt różnych białek. Wszystko to sprawia, że poznanie całego proteomu ludzkiego jest zadaniem o wiele bardziej złożonym niż poznanie genomu.

Obecnie badania proteomiczne koncentrują się wokół dwóch obszarów: pierwszy z nich związany jest z ekspresją białek a drugi z ich wzajemnymi oddziaływaniami. Proteomika ekspresji dąży do poznania wzorów ekspresji białka w określonych warunkach(np. w stanach chorobowych, w odpowiedzi na czynniki środowiska). Zmierza do ustalenia reprezentatywnej mapy całego proteomu, która mogłaby być wykorzystywana w badaniach nad rozwojem nowych leków, badaniach toksykologicznych oraz przy identyfikacji biomarkerów - białek, których poziom ekspresji może dostarczać informacji o wystąpieniu określonych chorób lub o skuteczności działania leku. Porównanie profili białkowych osób zdrowych i chorych w celu wykrycia różnic jest podstawowym zadaniem proteomiki klinicznej. Przeszukując cały proteom osoby chorej badacze trafiają na odchylenia - odmienną ekspresję białek niż w warunkach fizjologicznych, które stają się biomarkerami konkretnego stanu patologicznego. Jest to całkowicie odmienne podejście niż stosowane dotychczas (kiedy szukano jednego, określonego parametru) i wymaga zastosowania efektywnych technik pozwalających na porównanie złożonych mieszanin białek oraz ilościową i jakościową ocenę ich składu. Metody stosowane w proteomice zależą od wielu parametrów białek m.in. od poziomu ich ekspresji i modyfikacji, lokalizacji wewnątrz komórek czy złożoności ich

mieszanin. Technologie proteomiczne można podzielić na te stosowane do charakterystyki białek oraz generowania map białkowych a także te, które służą do badań funkcji białek i interakcji między nimi. Do pierwszej grupy proteomicznych narzędzi należy elektroforeza dwuwymiarowa oraz spektrometria mas a także techniki pozwalające na identyfikację białek takie jak „białkowy odcisk palca”. Do badań interakcji stosuje się głównie drożdżowy system dwuhybrydowy oraz metody oparte na immunopowinowactwie.

TECHNIKI STOSOWANE DO ROZDZIAŁU, IDENTYFIKACJI I OZNACZANIA ILOŚCI BIAŁEK

ELEKTROFOREZA 2D

Elektroforeza dwuwymiarowa w żelu poliakrylamidowym (2D-PAGE) jest powszechnie stosowaną metodą rozdziału białek. Dzięki zastosowaniu tej techniki możliwa jest detekcja białek oraz uzyskanie informacji o zmianach w ich ekspresji jakie zachodzą na tle całego proteomu. Elektroforeza przebiega w dwóch kierunkach czy też wymiarach. W pierwszym wymiarze białka rozdzielane są zgodnie z ich punktem izoelektrycznym, czyli wartością pH, przy której ich ładunek wypadkowy jest równy zero (tzw. ogniskowanie izoelektryczne, IEF), w drugim wymiarze natomiast następuje rozdział białek na podstawie ich masy cząsteczkowej. Powstały w ten sposób obraz obejmuje wiele plam, z których każda stanowi białko o określonych parametrach masy cząsteczkowej i punktu izoelektrycznego. Ta mapa białkowych plam może być traktowana jako „białkowy odcisk palca” analizowanej próby. Porównanie takich map pochodzących ze zdrowego i chorego organizmu może dostarczyć wiele informacji na temat konkretnego stanu fizjologicznego komórki. Mimo to elektroforeza ma pewne ograniczenia. Największą trudność sprawia uzyskanie profilu białkowego reprezentatywnego dla całego proteomu, ponieważ białka występujące w komórce różnią się rozpuszczalnością. Typowym składnikiem roztworów, w których przeprowadzana się elektroforezę jest mocznik, a jego działanie polega na rozrywaniu wiązań niekonwalencyjnych i jonowych. Jego ilość w buforze nie wystarcza do rozpuszczenia wszystkich białek występujących w badanej próbce. Przykładowo białka błonowe, hydrofobowe oraz o dużej masie cząsteczkowej mogą zostać nie wykryte przy zastosowaniu mocznika. Dlatego do poprawy skuteczności elektroforezy podczas ogniskowania izoelektrycznego do buforów dodawane są inne składniki, m.in. amfoliny, które zapobiegają agregacji białek i poprawiają przewodnictwo elektryczne, detergenty niejonowe, które wpływają na rozpuszczalność protein w warunkach niedenaturujących, np. Triton X-100, a także detergenty zwane CHAPS lub ASB (tzw. zwitterionic detergents), wpływające na rozpuszczalności białek błonowych, głównie roślinnych. Jednakże okazało się, że obecność tych ostatnich może wpływać na rozdział innych klas białek (np. hydrofilowych) obecnych w badanej próbce. Alternatywną metodą pozwalającą zwiększyć rozpuszczalność białek w elektroforezie jest ich frakcjonowanie w oparciu o wspólne właściwości biofizyczne lub ze względu na lokalizację w komórce, tak że pojedynczy bufor może zostać użyty do rozpuszczenia wielu białek w jednej frakcji.

Inny problem stanowi wykrywanie białek znajdujących się w próbce w niskich stężeniach. Szacuje się, że w danym czasie w komórce ulega ekspresji od 5 do 10 tys. genów co powinno skutkować syntezą ok. 20-30 tys. białek. Jednakże przy zastosowaniu elektroforezy możliwe jest wykrycie maksymalnie 3 tys. białek na żelu o wymiarach 18 x 20 cm² co oznacza, że wykrywane są jedynie białka występujące w próbce najliczniej. Jest to dosyć poważne ograniczenie elektroforezy ponieważ wiele białek regulatorowych, sygnałowych czy czynników transkrypcji, ważnych z punktu widzenia diagnostyki i prognostyki, występuje w niskich stężeniach. Najprostszym sposobem na eliminację tych ograniczeń jest wstępne frakcjonowanie badanej próby dzięki zastosowaniu wąskiego zakresu pH (jedna jednostka pH na 18 cm żelu) w ogniskowaniu izoelektrycznym. Niestety metoda ta jest czasochłonna i niepraktyczna dlatego często z elektroforezą stosowane są inne techniki separacji charakteryzujące się większą rozdzielczością takie jak elektroforeza kapilarna, ogniskowanie izoelektryczne czy metody chromatograficzne, m.in.: wysokosprawna chromatografia cieczowa

(HPLC), chromatografia kolumnowa czy chromatografia powinowactwa.

Ostatnim etapem elektroforezy jest wybarwienie białek w celu ich ilościowej identyfikacji. Powszechnie stosowanymi barwnikami są tu błękit Coomassie Brilliant Blue oraz sole srebra, które jednak są metodami mało czułymi i pozwalają wykryć białka w zakresie 10-40ng. Do poprawy czułości detekcji coraz częściej używane są znaczniki fluorescencyjne oraz cyjaninowe barwniki fluorescencyjne, które stosuje się w dwuwymiarowej fluorescencyjnej elektroforezie różnicowej 2D-DIGE. W tym wypadku białka są oznaczane jeszcze przed elektroforezą a wykrywane są już od 0,025-1ng.

SPEKTROMETRIA MAS

Spektrometria mas (MS) jest techniką analityczną znaną od ponad stu lat i służącą do identyfikacji związków chemicznych i ich mieszanin. Powstałe w ostatnich latach bazy danych i metody obliczeniowe stosowane w połączeniu z MS umożliwiają analizę próbek o wysokiej złożoności, identyfikację białek, ilościową ocenę ich ekspresji, ustalenie ich masy cząsteczkowej oraz składu aminokwasowego. Spektrometria mas może zostać łatwo zaadoptowana do wysoko przepustowego formatu dzięki czemu jest obecnie główną techniką stosowaną do badań nad proteomem. Analiza białek przy zastosowaniu spektroskopu masowego polega na jonizacji cząsteczek w stanie gazowym a następnie ich rozdzieleniu w zależności od stosunku ich masy do ładunków (m/z) co prowadzi do powstania widma masowego będącego podstawą do identyfikacji cząsteczki. Każdy spektrometr masowy zbudowany jest z trzech części: jonizatora, analizatora masy i detektora. W zależności od budowy i zasady działania jonizatora istnieją różne techniki jonizacji, jednak obecnie najczęściej stosowane są dwie, które rozwinięto ponad 10 lat temu i od tamtej pory zrewolucjonizowały one analizę związków chemicznych. Techniki te to MALDI czyli desorpcja laserowa z udziałem matrycy (z ang. Matrix assisted laser desorption/ionization) oraz ESI (electrospray ionization) - elektrorozpylanie. MALDI jest łagodną metodą jonizacji nie powodująca fragmentacji badanych cząsteczek. Matrycę stanowią małe cząsteczki zdolne do pochłaniania promieni UV, dzięki czemu po naświetleniu próby laserem o określonej długości fali dochodzi do przejścia zarówno matrycy jak i analizowanych cząstek w stan gazowy oraz ich jonizacji. Modyfikacją tej metody jest SELDI - powierzchniowo wzmocniona laserowa desorpcja/jonizacja, w której badana próbka jest wstępnie frakcjonowana przy zastosowaniu jednej z technik chromatograficznych. W przypadku elektrorozpylania do jonizacji cząsteczek dochodzi podczas rozpylania badanej próby z igły, do której przyłożono wysokie napięcie, dzięki czemu powstają wysoko naładowane kropelki. Zastosowanie gazu lub ciepła powoduje odparowanie rozpuszczalnika i z jonizatora wydostają się same zjonizowane peptydy. Pewnym ulepszeniem tej metody jest technika nano-ESI, w której już bardzo małe ilości analitu - kilka mikrolitrów- wystarczą do określenia masy cząsteczkowej i struktury rozpuszczonych w nim biomolekuł, a niskie natężenie przepływu badanej substancji, wynoszące kilka nanolitrów na minutę, pozwala na bardziej precyzyjny pomiar. Po tym jak jony opuszczą jonizator dostają się do najważniejszego elementu całej technologii - analizatora mas, którego zadaniem jest ich rozdział. Odbywa się to w polu elektrycznym lub magnetycznym na podstawie stosunku masy jonów do liczby ich ładunków (m/z). Podobnie jak w przypadku jonizatorów, istnieje wiele rodzajów analizatorów mas stosowanych w spektrometrach. Obecnie najbardziej popularnym analizatorem jest analizator czasu przelotu (z ang. Time Of Flight TOF), gdzie mierzony jest czas jaki zajmuje jonom przebycie drogi od jonizatora do detektora, a jego wartość zależy od stosunku m/z badanych jonów. Analizator TOF jest bardzo prosty w obsłudze i często używany w połączeniu z jonizatorem MALDI. W ostatnich latach zaczęto łączyć ze sobą dwa analizatory TOF tworząc w ten sposób tandemową spektrometrię mas (MS/MS), podczas której jony, po przejściu przez pierwszy analizator są rozbijane na fragmenty tzw. jony potomne i analizowane przez znajdujący się tuż za urządzeniem fragmentującym drugi analizator. Podejście to pozwala na fragmentację wcześniej wyselekcjonowanych peptydów i analizę mas poszczególnych aminokwasów a przez to ich

identyfikację. Fragmentacja peptydów odbywa się dzięki dysocjacji indukowanej zderzeniami (z ang. Collision-induced dissociation, CID), podczas której dochodzi do zrywania wiązań peptydowych w wyniku zderzeń zjonizowanych peptydów z cząsteczkami obojętnych gazów. Do najnowszych technik fragmentacji peptydów należą: ECD (z ang. electron capture dissociation) - rozpad z wychwytem elektronów oraz ETD (electron transport dissociation) - rozpad z transportem elektronów. Innym powszechnie używanym narzędziem jest analizator kwadrupolowy zwykle stosowany z jonizatorem ESI. Zbudowany jest on z czterech równoległych, metalowych prętów, które mogą zostać tak nastawione aby przepuszczały jedynie jony o określonej wartości stosunku masy do ładunku. Połączenie dwóch kwadrupoli pozwala na bardziej precyzyjną filtrację badanych cząstek, w ten sposób, że kolejny analizator przepuszcza jony o węższym zakresie stosunku m/z. Na podobnej zasadzie do kwadrupola działa pułapka jonowa (Ion trap IT) - analizator pozwalający uwięzić jony o określonym stosunku m/z. Dość popularne są również analizatory cyklotronowego rezonansu jonów (Ion Cyclotron Resonance ICR) oraz cyklotronowego rezonansu jonów z fourierowską transformacją wyników (Fourier Transform Ion Cyclotron Resonance FT-ICR) działające na zasadzie pułapkowania jonów i działania na nie polem elektromagnetycznym o zmiennej częstotliwości, tak że zaczynają one krążyć wokół przyłożonego pola z częstotliwością powiązaną z ich stosunkiem m/z. Ponieważ zarówno każdy jonizator jak i analizator mas posiada swoje wady i zalety często łączone są one w różnych konfiguracjach i w połączeniu z innymi technikami rozdzielania, tak aby maksymalnie wykorzystać potencjał każdego z urządzeń.

Na przestrzeni ostatnich lat rozwinęły się dwie strategie identyfikacji białek w oparciu o spektroskopię mas: „top-down” oraz „bottom-up”. W pierwszym podejściu wykorzystywane są spektrometry FTIRMS pozwalające, ze względu na swoją wysoką rozdzielczość, na analizę pojedynczych białek lub ich prostych mieszanin. Fragmentacja protein odbywa się wewnątrz spektrometru dzięki zastosowaniu techniki ECD. Analiza wartości m/z powstałych w ten sposób jonów wskazuje na ich pozycję w białku, tym samym ujawniając sekwencję aminokwasów co pozwala dane białko zidentyfikować. Tak otrzymana eksperymentalną sekwencję porównuje się do teoretycznych sekwencji białek znajdujących się w komputerowych bazach danych. Opracowaniem algorytmów pozwalających na dokładną identyfikację sekwencji i zautomatyzowanie całego procesu zajmuje się bioinformatyka. Po tym jak białko zostało zidentyfikowane znajomość jego dokładnej masy cząsteczkowej pomaga w określeniu stopnia jego modyfikacji. Głównym ograniczeniem tej techniki jest niemożliwość jej zastosowania do analizy dużych białek lub ich złożonych mieszanin. Metody tej używa się głównie przy identyfikacji małych protein (<10kD), które mają prawdopodobnie duże znaczenie biologiczne, jednak jak do tej pory ich rola jest mało poznana. Strategia „bottom-up” stanowi alternatywę opisaną wyżej metody. W tym podejściu mieszanina białek jest wstępnie frakcjonowana, tak że w spektrometrze analizowane są jedynie frakcje peptydów. W pierwszym wariantcie tej metody, zwanym czasem mapowaniem masowym, wykorzystywana jest dwukierunkowa elektroforeza żelowa (2D-PAGE) lub ogniskowanie izoelektryczne (IEF) do rozdzielania białek i określenia ich ilości. Następnie frakcje białek zostają wyekstrahowane z żelu, poddane wstępnemu trawieniu proteolitycznemu (np. trypsyną) a powstała w ten sposób mieszanina peptydów stanowi przenoszona jest do analizy w spektrometrze masowym (zwykle typu MALDI-TOF). Analizator masy mierzy masę cząsteczkową peptydów na podstawie ich wartości m/z, dzięki czemu powstaje „masowy odcisk palca” peptydów (Peptide Mass Fingerprint). Następnie, przy użyciu odpowiednich programów takich jak np. ProFound, MASCOT czy MS-Fit, przeszukiwane są proteinowe bazy danych w celu odnalezienia białka, które poddane trawieniu tym samym enzymem rozpadnie się na peptydy o takiej samej masie cząsteczkowej. Jakość uzyskanych wyników zależy przede wszystkim od czystości badanej próby, dokładności pomiaru oraz liczby zmierzonych peptydów. Drugi wariant, zwany także wielowymiarową technologią identyfikacji białek (MudPIT) lub proteomiką typu „shotgun”, polega na strawieniu badanej próby białek enzymami proteolitycznymi i dopiero wówczas poddaniu jej dalszej analizie. Mieszanina powstałych w ten sposób peptydów ulega rozdzielaniu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC) a następnie analizowana jest

przy użyciu tandemowego spektrometru mas. Ze względu na to, że kolumny chromatograficzne są bezpośrednio połączone z jonizatorem spektrometru cały proces jest w dużym stopniu zautomatyzowany a metoda przystosowana do wysoko przepustowych formatów. Podobnie jak w poprzednim wariacie uzyskane dane porównywane są z danymi zawartymi w bazach danych. Do przeszukiwania istniejących zbiorów informacji stosowane są tutaj takie programy jak Sequest, PROWL, Protein Prospector i MASCOT. Jeżeli w bazach danych nie ma informacji o szukanej sekwencji przeprowadza się sekwencjonowanie peptydów de novo.

PODSUMOWANIE

Poznanie ludzkiego proteomu, po zakończonym sukcesie projektu poznania ludzkiego genomu, jest kolejnym krokiem przybliżającym nas do zrozumienia podstawowych zjawisk biologicznych zachodzących nieustannie w żywych organizmach. Proteomika budzi zainteresowanie także dlatego, że uzyskana wiedza może zostać z powodzeniem wykorzystana w celu opracowania skutecznych metod leczenia, precyzyjnego diagnozowania chorób czy testowania efektywności leków. Obecnie do poszukiwania białkowych biomarkerów stosowane są techniki chromatograficzne oraz elektroforeza w połączeniu ze spektrometrią mas. Duże zainteresowanie budzą płyny ustrojowe (osocze, mocz) jako łatwo dostępne źródło biomarkerów co między innymi doprowadziło do powstania w 2008r projektu EUROKUP (European Urine and Kidney Proteomics), którego celem jest identyfikacja i weryfikacja biomarkerów dzięki proteomicznej analizie moczu. Ponad to w badaniach proteomicznych upatruje się szansy zrozumienia poszczególnych etapów nowotworzenia, co pozwoliłoby zrewolucjonizować podejście do leczenia raka. Niestety rozwój i ulepszenie stosowanych dotychczas metod jest konieczne aby skutecznie i sprawnie identyfikować białka. Zastosowanie pojedynczej technologii nie dostarczy odpowiedzi na wszystkie pojawiające się pytania, dlatego istnieje potrzeba połączenia różnych technik proteomicznych i stworzenia jednej zintegrowanej strategii. Potrzebna jest także metoda pozwalająca określić wzajemne oddziaływania między białkami a także sprawne metody obliczeniowe pozwalające przewidzieć ich funkcje, dzięki czemu możliwe będzie stworzenie map interakcji komórkowych i większe zrozumienie procesów jakie w tych komórkach zachodzą. Obecnie największe wyzwania stojące przed proteomiką skupiają się wokół trzech kwestii: sekwencjonowaniu peptydów de novo, identyfikacji modyfikacji potranslacyjnych oraz określaniu ilości białek przy użyciu spektrometrii mas.

Autor: Aleksandra Mazur

Bibliografia

1. Bączek T. Usprawnienie identyfikacji peptydów w proteomice z wykorzystaniem chemometrycznej analizy danych. Rozprawa habilitacyjna. Wydział Farmaceutyczny, Akademia Medyczna w Gdańsku. Gdańsk. 2006
2. Karas M., Bahr U., Dulcks T. Nano electrospray ionization mass spectrometry addressing analytical problems beyond routine. *Fresenius J Anal Chem* (2000) 366:669-676
3. Kossowska B., Dudka I., Gancarz R., Antonowicz-Juchniewicz J. Analiza proteomiczna profili białkowych w niektórych stanach patologicznych ludzkiego organizmu. *Postepy Hig Med. Dośw.* 2009; 63:549-563
4. Lin D., Tabb D. L., Yates III J. R., Large-scale protein identification using mass spectrometry. *Biochimica et Biophysica Acta* 1646 (2003) 1 - 10
5. Niemczyk M., Pączek L. Proteomika w nefrologii klinicznej. *Nefrol. Dial. Pol.* 2010, 14: 31-33
6. Silberring J. Problemy proteomiki klinicznej - trendy, niebezpieczeństwa i problemy. *Postępy Biologii Komórki*. Tom 36, 2009, suplement nr 25 (111-115)
7. Yarmush H. L., Jayaraman A. *Advances in Proteomics Technologies. Annu.Rev.Biomed Eng.* 2002; 4:349-73

8. Yates J. R, Ruse C. I., Nakorchevsky A. Proteomics by Mass Spectrometry: Approaches, Advances, and Applications. Annu. Rev. Biomed. Eng. 2009. 11:49-79

<http://laboratoria.net/artukul/12612.html>

Informacje dnia: [Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14 Zdrowych i Pogodnych Świąt Bożego Narodzenia Zapraszamy na wyjątkową edycję Targów PCI Days 2025! Zawał już dawno przestał być chorobą mężczyzn Świąteczna apteczka Radioaktywny pluton się nie ukryje Złoty Medal Chemii przyznany po raz 14](#)

Partnerzy