

Wrocław, 02-12-2024

Recenzja pracy doktorskiej Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego pt. „Projektowanie i charakterystyka fluoroforów zawierających grupę BF₂”

Barwniki fluorescencyjne to ogromna grupa związków organicznych i nieorganicznych o rozmaitych właściwościach fotofizycznych znajdujących zastosowanie w licznych dziedzinach nauki czy przemyśle, takich jak biotechnologia, medycyna, produkcja czy zastosowanie powłok emitujących światło opartych na technologiach OLED. Badanie podstawowych jak i patologicznych procesów zachodzących na poziomie komórek, tkanek czy całych organizmów nie byłoby możliwe bez mikroskopii fluorescencyjnej w postaci powszechnie używanych mikroskopów konfokalnych, dwufotonowych czy czasowo-rozdzielczych. Spośród ogromnej liczby związków organicznych o właściwościach fluorescencyjnych tylko nieliczne z nich okazały się wysoce przydatne ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne. Niestety i one posiadają swoje wady jak chociażby niewystarczającą fotostabilność, wysoką energię absorpcji czy emisji promieniowania daleką od tak zwanego okna biologicznego, czy niewystarczającą odpowiedź na zmiany w środowisku komórkowym utrudniające bioobrazowanie. Mimo wielu lat badań nad opracowywaniem nowych cząsteczek o właściwościach fluorescencyjnych istnieje nadal ogromna potrzeba tworzenia nowych, o jeszcze odpowiednio dostosowanych parametrach fizykooptycznych i chemicznych. Właśnie w ten nurt badań wpisuje się recenzowana rozprawa doktorska Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego. Praca została wykonana w Zakładzie Chemii Organicznej na Wydziale Chemii, Uniwersytetu Mikołaja Kopernika w Toruniu pod kierunkiem Pana prof. dr. hab. inż. Borysa Ośmiałowskiego. Promotorem pomocniczym pracy jest Pani dr hab. Anna Kaczmarek-Kędziera, prof. UMK. Praca doktorska Pana Patryka Rybczyńskiego jest przykładem świetnie wykonanej pracy z pogranicza chemii organicznej, fizykochemii, metod obliczeniowych a nawet biochemii. Stanowi ona kontynuację wieloletnich badań prowadzonych przez promotora, prof. dr. hab. Borysa Ośmiałowskiego.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska, licząca 110 stron, ma charakter klasycznej rozprawy doktorskiej i została napisana w języku polskim. Zawiera wprowadzenie teoretyczne, cel i metodologię badań oraz rezultaty wraz z dyskusją zebrane w postaci dwóch rozdziałów, podsumowanie i wnioski oraz bibliografię składającą się ze 191 pozycji. Brak jest abstraktu pracy. Przed cytowaną literaturą znajdują się dwa załączniki nazywane w pracy dodatkiem A i B. Pierwszy z nich to katalog związków wraz z wzorami i pełną charakterystyką NMR i HRMS, natomiast drugi to lista publikacji związanych i niepowiązanych z tematem pracy doktorskiej. Za spisem treści znajduje się również przydatny spis rysunków i tabel, choć zdecydowanie bardziej przydatny byłby spis skrótów używanych w pracy. Całość przygotowana jest bardzo estetycznie i zachęca do lektury. Wartym podkreślenia jest fakt, że recenzowana praca jest dość krótkim dziełem, co nie jest jej wadą, lecz zaletą. Sporym wyzwaniem jest bowiem napisanie pracy, która zawierałaby wszystkie najważniejsze elementy, przedstawione w krótki i zarazem wyczerpujący sposób. Z doświadczenia recenzenta wiem, że jest to zazwyczaj możliwe wówczas, gdy doktoranci mają bardzo

dobrze opanowany warsztat, ogromną wiedzę i zrealizowali pracę z sukcesem. Wówczas do własnego dzieła podchodzą z dystansem i troską o czytelników. Niewątpliwie opublikowanie wyników pomogło Autorowi w przygotowaniu skondensowanej rozprawy.

Wprowadzenie do pracy, liczące 23 strony, podzielone jest na dwie części. W pierwszej w nich Autor zaprezentował najważniejsze pojęcia powiązane ze zjawiskami fotofizycznymi, takimi jak: absorpcja, fluorescencja, fosforescencja zaś podsumował je za pomocą klasycznego diagramu Jabłońskiego. Prezentuje tu w sposób przejrzysty różnice pomiędzy przejściami promienistymi i bezpromienistymi, wprowadzając czytelnika między innymi w mechanizm konwersji wewnętrznej czy przejść międzysystemowych. Wprowadza także pojęcie wydajności kwantowej czy czasu życia fluorescencji, tak bardzo istotne w charakterystyce ale przede wszystkim w zastosowaniach barwników. Autor podkreślił również rolę otoczenia cząsteczki wzbudzonej jako czynników biorących istotny udział w dezaktywacji stanu wzbudzonego cząsteczki. Opisał tu efekt solwatochromowy, oddziaływania międzycząsteczkowe czy agregację molekuł. Drugą część wstępu stanowi wprowadzenie do najważniejszych klas barwników fluorescencyjnych z opisem ich budowy i właściwości. Szczególną uwagę poświęcił fluoroforom, w których zachodzi wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku. Co istotne dla samej rozprawy, Autor zaprezentował także najistotniejsze strategie związane z projektowaniem fluoroforów takie jak: benzoannulacja, tworzenie mostków π -elektronowych czy wpływ poszczególnych podstawników na właściwości fotofizyczne. To czego zabrakło mi we wstępie, to wprowadzenie do różnorodnych aplikacji fluoroforów. Mam tu na myśli głównie zastosowania biofizyczne/biochemiczne, ale przede wszystkim komórkowe. Wszak potrzeba opracowania nowych i wydajniejszych barwników w celach aplikacyjnych, głównie biologicznych, poruszana jest przez Doktoranta od początku swojej rozprawy. Autor wspomina, co prawda, po krótko o pewnych zastosowaniach ale są one raczej dodatkiem do wymienianych klas fluoroforów. W związku z tym, że to zagadnienie poruszone jest, w mojej ocenie dość lakonicznie w rozprawie, proszę by podczas publicznej obrony Doktorant w sposób syntetyczny i obrazowy przedstawił nie tylko zalety (np. wydajność kwantowa vs. przesunięcie Stokes'a) czy wady (np. fotowysypanie) prezentowanych klas związków ale może przykłady poszczególnych sond użytych w konkretnych celach. Pomoże to zrozumieć odbiorcom nie tylko chemię czy fizykochemię będącą celem działań ale również potencjał aplikacyjny syntetycznych fluoroforów.

Cel pracy przedstawiony został w postaci półtorastronicowego rozdziału. Już na początku, Autor jasno informuje, że punktem wyjścia do projektowania nowych fluoroforów w swoim projekcie jest tioflawina T, wykorzystywana powszechnie w badaniach agregacji białek, w tym peptydów amyloidowych. Jest ona czuła na zmiany w lepkości i polarności środowiska, jednakże ze względu na problemy ze spektralnym zakresem absorpcji i emisji dalekim od okna biologicznego, ogranicza się głównie do zastosowań biofizykochemicznych. By osiągnąć cel, Doktorant zamierza zmodyfikować strukturę tioflawiny T, poprzez usztywnienie cząsteczki za pomocą grupy BF_2 wchodzącej w skład barwników BODIPY, charakteryzujących się wysoką wydajnością kwantową. Owa wysoka wydajność kwantowa wiąże się zazwyczaj z małym przesunięciem Stokes'a. W związku z tym Doktorant, poza usztywnieniem platformy fluorescencyjnej, zaproponował wprowadzenie szeregu podstawień mających na celu obniżenie energii absorpcji/emisji i zwiększenie przesunięcia Stokes'a. Poszczególnymi celami pracy stało się zatem (i) zaprojektowanie struktur barwników na podstawie danych literaturowych, (ii) synteza barwników z różnymi podstawnikami, (iii) charakterystyka fotofizyczna w rozpuszczalnikach o różnej lepkości i polarności czy (iv) analiza zmian właściwości fotofizycznych pod wpływem agregacji.

Część metodologiczna pracy stanowi dwustronicowy rozdział, według mnie sprowadzony do niezbędnego minimum. Zawiera on opis syntezy i sposób charakterystyki związków wraz z przydatnym schematem zawierającym ogólny wzór barwników oraz listę poszczególnych podstawników. W rozdziale

tym znajduje się opis pomiarów absorpcji i fluorescencji oraz agregacji. Ze względu na brak szczegółowych opisów oraz materiałów w tej sekcji Autor, chcąc zachować minimalistyczny opis tej części, powinien odnieść czytelnika do poszczególnych publikacji, czy to swoich czy innych autorów. Takowych odsyłać, poza odniesieniem się do celi całkującej, brak jest w tym rozdziale. Nie znalazłem również opisu badań rentgenograficznych, o których wspomina Autor w podrozdziale 4.2.1 (w rozprawie brak jest prezentacji struktur(y) X-ray) oraz o metodach obliczeniowych (obliczona struktura przedstawiona jest na Rycinie 5.7), których wyniki pojawiają się w tekście. Nie ma też nawet najmniejszej wzmianki o badaniach właściwości fotofizycznych w środowisku zawierającym amyloidy insuliny bydłowej. Badania te, choć wykonane we współpracy z innymi badaczami, stanowią ważny element całości pracy i opis ich wykonania powinien zostać zawarty w rozdziale metodologicznym lub przynajmniej zacytowany.

Pierwszy rozdział wynikowy rozprawy dotyczy wpływu topologii syntezowanych związków oraz charakteru podstawników na właściwości fotofizyczne badanych barwników. W pierwszej kolejności Autor przedstawił charakterystykę serii pochodnych benzotiazolowych o ogólnym wzorze OMeBtR' zawierającą dziewięć barwników. Ogólną topologię tych związków można przedstawić ogólnie jako Donor-Akceptor-Podstawnik R'. Przedstawione są tu krok po kroku wyznaczone parametry fizykochemiczne widm absorpcyjnych i emisyjnych takie jak molowy współczynnik absorpcji, długość fali maksimum absorpcji/emisji, szerokość połówkowa pasm, przesunięcie Stokes'a, wydajność kwantowa fluorescencji, czas życia fluorescencji, stałe szybkości przejść promienistych i bezpromienistych. Spośród uzyskanych związków tylko pochodna OMeBt4-NMe₂ charakteryzuje się wysoką wydajnością kwantową. Pozostałe związki posiadają niskie lub wyraźnie niskie wydajności kwantowe i stosunkowo duże przesunięcia Stokes'a. Doktorant krok po kroku koreluje uzyskane parametry ze stałymi Hammetta wnioskując na temat ich zgodności lub braku zgodności z oczekiwanymi parametrami. Bardzo zgrabnie wyjaśnia zaobserwowane odstępstwa wskazując bądź na wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku, jak w przypadku pochodnej nitrowej, szybkości konwersji wewnętrznej, bądź balansu pomiędzy stałymi szybkości przejść promienistych oraz bezpromienistych i powiązaną z tym zmianą geometrii cząsteczki w stanie wzbudzonej czy podstawowym. Zawarta w tym, jak i późniejszych rozdziałach, dyskusja na temat przyczyn takich, czy innych cech związków, odstępstw od spodziewanych wartości jest niezwykle przejrzysta i bardzo dojrzała. Mam pytanie o błędy wyznaczanych parametrów, np. molowych współczynników absorpcji czy szybkości przejść. Nie są one podane w tekście i domyślam się, że nie były szacowane. Jakiego błędu w ich wyznaczeniu można się spodziewać?

W związku z tym, że uzyskane związki charakteryzowały się albo słabą wydajnością kwantową, bądź niskim przesunięciem Stokes'a, Doktorant w kolejnym kroku swoich badań wykonał syntezę 11 pochodnych benzotiazolowych o ogólnym wzorze CF₃BtR' o wyraźnie wzmocnionych cechach fluorescencyjnych. Zmiana strukturalna względem poprzedniej serii polegała na wymianie donora elektronów, grupy -OMe na akceptor elektronów -CF₃ w części heterocyklicznej. Ogólną topologię cząsteczek w tej serii Autor przedstawia jako Akceptor-Akceptor-podstawnik R' o zmiennym charakterze akceptorowo-donorowym. Podobnie jak dla pierwszej serii, Doktorant przeprowadził badania fotofizyczne w chloroformie i wyznaczył parametry optyczne. Obecność grupy -CF₃ w strukturze spowodowała zwiększenie energii przejść do stanu wzbudzonego, co zaskutkowało przesunięciem hipsokromowym. Różnica w położeniu maksimum emisji wynika nie tylko z efektu podstawnika, ale również z balansu intensywności składowych wibracyjnych pasm emisyjnych. Zależnie od stosunku intensywności tych składowych, maksimum emisji i przesunięcie Stokes'a zachowują się nieregularnie skutkując niską korelacją ze stałą Hammetta. Jest to dobrze zauważalne dla dwóch izomerycznych związków CF₃Bt4-F i CF₃Bt3-F a także dla CF₃Bt3-F i CF₃Bt4-Br. Znacznie lepsza korelacja ze stałą Hammetta obserwowana jest dla wydajności kwantowych. Należy jednak podkreślić, że stała Hammetta nie opisuje w żaden sposób

cząsteczek w elektronowym stanie wzbudzonym i została wyznaczona dla modelowych cząsteczek w stanie podstawowym. Niesie ona jednak użyteczną informację dotyczącą charakteru donorowo-akceptorowego podstawnika, a jej korelacje z wybranymi właściwościami fotofizycznymi są przydatne oraz uzasadnione. Pomiar czasu życia fluorescencji i obliczenia stałych szybkości przejść promienistych i bezpromienistych dla tej serii pokazały, że wzajemny stosunek tych stałych silnie zależy od podstawnika w grupie fenylowej. Prawdopodobieństwo przejść bezpromienistych jest tym większe, im silniejszy akceptor elektronów jest obecny w cząsteczce. Wzrost przesunięcia Stokes'a wraz ze spadkiem wydajności kwantowej fluorescencji wskazuje na istotne zmiany geometrii cząsteczki podczas pobudzenia elektronowego. Warte podkreślenia są badania przeprowadzone na dodatkowo zsyntezowanych związkach będących regioizomerami. Powodem tego zabiegu była obserwacja skrajnie odmiennych właściwości fotofizycznych dla symetrycznych układów Akceptor-Akceptor-Donor i Donor-Akceptor-Akceptor. Zarówno Tabela 5.3. jak i Rycina 5.6 w bardzo obrazowy sposób demonstrowają jak rodzaj podstawnika w grupie fenylowej i w benzotiazolu różnicuje wydajność kwantową fluoroforów. Wyniki te pokazują, że rotacja fragmentów cząsteczki (przywoływana dla rotorów molekularnych jako dominujący proces dezaktywacji stanów wzbudzonych) nie stanowi głównej ścieżki wygaszania stanu wzbudzonego.

Aby poznać wpływ drgań cząsteczek na wydajność kwantową fluorescencji, Doktorant w kolejnym kroku badań przeprowadził charakterystykę fotofizyczną w roztworach o różnej lepkości dla barwników posiadających w swojej strukturze podstawniki -OMe i/lub -CF₃ oraz pochodnej niepodstawionej. Dla wszystkich przebadanych związków dało się zauważyć liniową zależność między logarytmem wydajności kwantowej i logarytmem lepkości a współczynnik kierunkowy prostej określał czułość barwnika na zmiany lepkości. Dane zestawione w Tabeli 5.4 i Rycinie 5.8 ukazują, że związek HBt4-CF₃ jest najbardziej czuły, a najmniej czułe pozostają związki posiadające grupę metoksyłową w pierścieniu fenylovym. Ogólnie, dla związków o najniższej wydajności kwantowej w chloroformie zauważono największy wzrost tego parametru wraz ze wzrostem lepkości medium. Dodatkowo, pomiary czasu życia fluorescencji i obliczenia stałych szybkości przejść ukazały, że ograniczenie ruchów cząsteczki w stanie wzbudzonym wynikające ze wzrostu lepkości powoduje znaczący spadek stałej szybkości przejść bezpromienistych bez istotnej zmiany stałej szybkości przejść promienistych. Balans między nimi powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa przejść promienistych, a tym samym wzrost wydajności kwantowej. Bardzo ciekawe badania zostały przeprowadzone we współpracy z grupą z Politechniki Wrocławskiej, w których dla każdego z badanych związków zauważono wzrost wydajności kwantowej po związaniu z amyloidami insuliny wołowej. Analiza przejść promienistych i bezpromienistych wykazała, że cząsteczki związane z białkiem mają ograniczoną swobodę ruchów, co zmniejsza prawdopodobieństwo konwersji wewnętrznej. Uzyskane dane pokazały, że pochodna OMeBt4-OMe wykazywała większy wzrost wydajności kwantowej po związaniu z amyloidami niż wzrost obserwowany dla modelowej Tioflawiny T. Badania z udziałem amyloidów zdecydowanie zwiększają wartość uzyskanych wyników. Nie jest jednak dla mnie jasne w jaki sposób były uzyskiwane amyloidy i kontrolowany był proces fibrylacji. Proszę o informację na ten temat podczas obrony.

W kolejnym kroku badań, Doktorant zaproponował modyfikacje podstawników donorowych, co miało na celu przesunięcie batochromowe widm emisyjnych z jednoczesnym zachowaniem wysokiej wydajności kwantowej. Zaprojektował i otrzymał serię sześciu barwników o topologii Akceptor-Akceptor-Donor, które miały wykazywać wewnątrzcząsteczkowe przeniesienie ładunku. Rolę donora elektronów miały pełnić grupy aminowe o różnej architekturze. Trzy z uzyskanych związków (CF₃Bt4-NMe₂, CF₃BtPyr, CF₃BtMor) charakteryzowały się wysoką wydajnością kwantową i stosunkowo małym przesunięciem Stokes'a. Pozostałe trzy CF₃DPA, CF₃BtCz, CF₃BtPhenox posiadały natomiast zwiększone przesunięcie Stokes'a, lecz tylko dla pierwszych dwóch wydajność kwantowa wynosiła powyżej 50%

(odpowiednio 63 i 58%). Widma emisyjne tych dwóch związków posiadają znacznie większą szerokość połówkową w stosunku do pasm absorpcji wynikające z relaksacji wibracyjnej. Wzrost przesunięcia Stokes'a wskazuje natomiast na większy wzrost momentu dipolowego w stanie wzbudzonym w stosunku do momentu dipolowego w stanie podstawowym. Czas życia fluorescencji dla tych związków uległ również zwiększeniu. Wzrost stałych szybkości przejść bezpromiennych sugeruje, że po wzbudzeniu cząsteczki może następować wzrost kąta dwuściennego między donorem elektronów i rdzeniem beznotiazolowym, co powoduje zwiększenie prawdopodobieństwa wewnętrznej konwersji do stanu podstawowego. Testy wpływu zmiennej polarności rozpuszczalnika wykazały, że pochodne zawierające w części donorowej grupy alkilowe nie zmieniają praktycznie wydajności kwantowej w heksanie i THF. W przypadku CF₃BtDPA i CF₃BtCz wydajność kwantowa drastycznie spada przy przejściu z heksanu do THF, a pasmo emisji poszerza się i przesuwa wyraźnie w kierunku batochromowym. Badania aplikacyjne z wykorzystaniem amyloidów insuliny bawolej pokazały, że po związaniu barwnika z amyloidami insuliny bawolej zmienia się położenie odpowiedniego pasma emisji i spada emisja w porównaniu do roztworów w THF, mniej dla pochodnych alifatycznych a wyraźniej dla aromatycznych. Wynika to z faktu, że cząsteczki barwnika lokują się w kieszeniach hydrofobowych agregatów białkowych. Jedną z ciekawszych obserwacji w tej części badań jest to, że badane związki wykazują absorpcję dwufotonową w zakresie od 820 do 880 nm mieszcząc się w tzw. oknie biologicznym. Otrzymane wyniki stanowią obiecujący punkt wyjścia do dalszych badań mających na celu uzyskanie wysokich przekrojów czynnych na absorpcję dwufotonową. Badania agregacji wykazały, że fluorescencja pochodnych alifatycznych jest praktycznie wygaszana w agregatach. Jednak w wyniku silnego powinowactwa do biomolekuł może następować ich uwalnianie i pojawienie się silnej fluorescencji ze względu na to, że barwniki te wykazują bardzo dobre właściwości emisyjne w środowisku niepolarnym i środoniopolarnym.

Rozprawa doktorska Pana Rybczyńskiego nie zawiera osobnego rozdziału pt. „Dyskusja” wyników. Rezultaty badań były dyskutowane na bieżąco przy ich opisie. To, czego mi zabrakło w rozprawie, być może przez brak osobnego rozdziału „Dyskusja”, to porównanie własnych wyników z osiągnięciami innych autorów parających się podobnymi zagadnieniami. Przedstawienie mocnych i słabych stron właściwości fizykochemicznych otrzymanych barwników w świetle innych fluoroforów dodałoby i tak do bardzo dojrzałej pracy dodatkowego waloru.

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Rybczyńskiego prezentuje bardzo dobrze zrealizowany projekt pracy doktorskiej, za sukcesem którego stoi Doktorant jak i Promotorzy pracy. Praca napisana jest poprawną polszczyzną i poza nielicznymi błędami natury interpunkcyjnej czy tzw. literówek nie znalazłem poważniejszych błędów. Praca opatrzona jest jasnymi i bardzo dobrze przygotowanymi ilustracjami i schematami. Nie mam zasadniczych zastrzeżeń merytorycznych do recenzowanej pracy. Czytając pracę próbowałem zaznaczyć fragmenty do dalszej dyskusji z Doktorantem, jednakże kolejne zdania czy akapity rozjaśniały praktycznie w pełni niejasności ograniczając tym samym komentarze w recenzji. Mimo tego, do wymienionych wyżej pytań czy uwag chciałbym dodać następujące, wynikające głównie z ciekawości i chęci dyskusji z Doktorantem:

- Otrzymał Pan szereg nowych barwników fluorescencyjnych o różnych właściwościach fizykochemicznych. Ich zastosowanie aplikacyjne zazwyczaj związane jest nie tylko z samą platformą fluorescencyjną ale z możliwościami jakie daje sama cząsteczka. Jakie widzi Pan możliwości wykorzystania sond fluorescencyjnych bazujących na uzyskanych przez Pana fluoroforów?
- W związku z brakiem dyskusji porównawczej z innymi fluoroforami i sondami, czy mógłby Pan przedstawić wady i zalety swoich platform fluorescencyjnych w porównaniu z tymi, które obecnie cieszą się największym powodzeniem aplikacyjnym?

- Jakimi parametrami fizykochemicznymi powinny charakteryzować się najlepsze fluorofory do zastosowań wewnątrzkomórkowych?

Reasumując, mimo drobnych niedociągnięć, o których wspomniałem powyżej, stwierdzam, że przyszło mi recenzować bardzo ciekawą pracę, której wyniki są wartościowe pod względem technicznym i naukowym. Praca Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego to przykład świetnie zrealizowanego projektu badawczego wykraczającego poza ogólnie pojętą chemię organiczną. Stwierdzam zatem, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego w pełni spełnia warunki określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 ze zm.), przepisy wprowadzające ustawę o Szkolnictwie Wyższym i Nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1669 ze zm.) oraz sposobie postępowania w sprawie nadania stopnia doktora na Uniwersytecie Mikołaja Kopernika w Toruniu. Wnioskuje zatem do Rady Naukowej Wydziału Chemii UMK o dopuszczenie Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora. Biorąc pod uwagę fakt, że wyniki przedstawione w rozprawie zostały w pełni opublikowane w prestiżowych czasopiśmie naukowych, Kandydat posiada bogaty i ciągle rosnący dorobek naukowy, przygotował bardzo dobrą rozprawę oraz, lub przede wszystkim to, że wyniki badań Doktoranta mają ogromny potencjał aplikacyjny, zwracam się do Rady Naukowej Wydziału Chemii UMK o wyróżnienie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Patryka Rybczyńskiego.

Z wyrazami szacunku,
Artur Krężel

