

WPŁYW TEMPERATURY PRZECHOWYWANIA SUROWICY KRWI LUDZKIEJ NA STĘŻENIE INTERLEUKINY 13

INFLUENCE OF THE STORAGE TEMPERATURE OF THE HUMAN BLOOD SERUM ON THE
INTERLEUKIN 13 CONCENTRATION

Kinga Lis

Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej, Collegium Medicum im. L. Rydygiera w Bydgoszczy,
Uniwersytet Mikołaja Kopernika w Toruniu
Kierownik Katedry: prof. dr hab. Grażyna Odrowąż-Sypniewska

STRESZCZENIE

Celem pracy była ocena stabilności IL-13 w surowicy przechowywanej przez okres 4 miesięcy w różnych warunkach temperatury. Materiał do badań stanowiła surowica krwi żyłnej pobranej od 20 zdrowych osób w wieku od 20 do 34 lat. Surowica podzielona na 4 porcje była przechowywana w różnych warunkach temperatury: 4 miesiące w temperaturze 2–8°C, 2 tygodnie w temperaturze 2–8°C, a następnie w temperaturze –70°C do 4 miesięcy od pobrania, 4 miesiące w temperaturze –20°C oraz 4 miesiące w temperaturze –70°C. We wszystkich próbkach surowicy testem ELISA oznaczono stężenie IL-13. Badania wykonano w jednej serii. Analiza statystyczna otrzymanych wyników pozwoliła zaobserwować, że długoterminowe przechowywanie surowicy w celu oznaczenia stężenia IL-13 wymaga zamrożenia próbek badanych w temperaturze –70°C bezpośrednio po odwirowaniu wykrzepionej krwi i utrzymywania ich w stanie głębokiego zamrożenia do czasu wykonania badania.

Słowa kluczowe: IL-13, surowica, temperatura przechowywania.

SUMMARY

The aim of study was an evaluation of the IL-13 stability in serum stored by the period of 4 months in different conditions of temperature.

Serum of the venous blood collected from 20 healthy persons (20–34 years old), divided in 4 portions was stored in different conditions of the temperature: 4 months in temperature 2–8°C, 2 weeks in temperature 2–8°C and then in the temperature –70°C up to 4 months from collecting, 4 months in the temperature –20°C and 4 months in the temperature –70°C.

Serum level of IL-13 was measured by ELISA technique in one series.

Statistical analysis of received results of the laboratory tests showed, that long-term storing serum intended to measure of concentration IL-13 requires freezing samples of serum in the temperature –70°C directly after blood collected and storing them in this conditions during the assay.

Key words: IL-13, serum, storing temperature.

WSTĘP

Interleukiny stanowią część bardzo zróżnicowanej grupy białek tworzących wspólną rodzinę cytokin. Obecnie znanych jest ponad 30 różnych interleukin pełniących rozmaite funkcje regulatorowe i modulujące [1, 2].

W zależności od przyjętych kryteriów wyodrębniono kilka grup cytokin. Jeden z częściej przytaczanych podziałów wyszczególnia chemokiny, interleukiny, czynniki wzrostu, interferony oraz czynniki mar-

twicy nowotworów [1–4]. Charakter stymulowanych przez te białka procesów pozwala je podzielić na cytokiny o działaniu prozapalnym, jak np.: interleukiny (IL) IL-1, IL-2, IL-8, IL-18 oraz czynnik martwicy nowotworów α (TNF- α), oraz cytokiny o działaniu przeciwzapalnym, do których zalicza się m.in. IL-4, IL-10, transformujący czynnik wzrostu (TGF- β) oraz antagonistę receptora dla IL-1 (IL-1Ra). Cytokiny prozapalne stymulują powstawanie i przebieg procesu zapalnego, rola cytokin przeciwzapalnych polega zaś na hamowaniu reakcji ostrej fazy. Neutralną pozycję

zajmuje IL-6, która wykazuje cechy cytokiny pobudzającej, a także hamującej przebieg procesu zapalnego [4, 5, 6].

Cytokiny są produkowane i wydzielane przez rozmaite komórki, zarówno układu immunologicznego, jak i innych tkanek i narządów. Do syntezy cytokin zdolne są m.in. monocyty, makrofagi, komórki śródbłonna, fibroblasty, komórki dendrytyczne, keratynocyty, limfocyty T i B, mastocyty, granulocyty, komórki siateczki szpiku kostnego, komórki śledziony oraz osteoblasty [1, 3].

Interleukina 13 (IL-13) jest wytwarzana przez pobudzone limfocyty Th2, limfocyty T CD8+, komórki NK i komórki tuczne. Ma podobne właściwości biologiczne jak IL-4. IL-13 reguluje ekspresję antygenów na powierzchni monocytów. Hamuje zależną od przeciwciał cytotoxyczność oraz wytwarzanie cytokin prozapalnych przez monocyty oraz pobudza syntezę cytokin przeciwzapalnych. IL-13 hamuje również wytwarzanie IgE oraz pobudza produkcję immunoglobuliny G4 (IgG4) i immunoglobuliny M (IgM). IL-13 stymuluje proliferację limfocytów B. Limfocyty T nie są wrażliwe na działanie tej interleukiny. Interleukina 13 uczestniczy w regulowaniu odpowiedzi immunologicznej na zakażenie pasożytami [1, 2].

Oznaczanie stężenia cytokin, w tym także IL-13, w surowicy, osoczu lub innych płynach biologicznych wykorzystywane jest zarówno w celach diagnostycznych, terapeutycznych, jak i badawczych [2, 7]. Badanie to przeprowadza się zazwyczaj technikami immunoenzymatycznymi w fazie stałej, co powoduje konieczność gromadzenia przeznaczonego do badań laboratoryjnych materiału biologicznego w celu wykonania oznaczenia w jednej, dużej serii. Przeprowadzenie tego typu oznaczeń w jednej serii zwiększa bowiem czułość badania i porównywalność uzyskanych wyników. Jednakże konieczność badania prowadzonego w seriach wymusza długotrwałe przechowywanie pobranego materiału biologicznego.

CEL PRACY

Celem pracy była ocena stabilności IL-13 w surowicy krwi żyłnej przechowywanej przez okres 4 miesięcy w różnych warunkach temperatury.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiła surowica krwi żyłnej pobranej od 20 zdrowych osób w wieku od 20 do 34 lat.

Krew w objętości 7 ml została pobrana z żyły łokciowej do suchej, szklanej probówki, bez dodatków, za pomocą zamkniętego systemu próżniowego *Vacutimer* (*Becton Dickinson*). Krew pobrano w warunkach standardowych, tzn. pomiędzy godziną 7.00 a 9.00 rano, od osób będących na czczo i po całonocnym wypoczynku.

Próbki krwi po pobraniu pozostawiono w celu ich całkowitego wykrzepienia w temperaturze pokojowej przez 30 minut. Po tym czasie wykrzepioną krew odwirowywano przez 15 minut z szybkością 3000 obr/min. Surowicę krwi uzyskaną w odwirowaniu oddzielono od skrzepu krwinek. Z każdej próbki krwi uzyskano około 3 ml surowicy. Każda próbka surowicy została podzielona na 4 porcje (A, B, C, D), po około 0,7 ml. Próbki te następnie przechowywano w następujących warunkach temperatury:

- porcja A – próbka surowicy przechowywana w temperaturze 2–8°C przez okres 4 miesięcy,
- porcja B – próbka surowicy przechowywana 2 tygodnie w temperaturze 2–8°C, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze –70°C,
- porcja C – próbka surowicy przechowywana 4 miesiące w temperaturze –20°C,
- porcja D – próbka surowicy przechowywana 4 miesiące w temperaturze –70°C; porcja D stanowiła próbkę odniesienia.

Po upływie 4 miesięcy wszystkie próbki surowicy doprowadzono do temperatury pokojowej i oznaczono w nich stężenie IL-13 oraz stężenie białka całkowitego. Wszystkie badania laboratoryjne zostały wykonane w jednej serii.

Stężenie IL-13 przeprowadzono techniką ELISA za pomocą gotowego zestawu Human IL-13 ELISA Kit (*Bender MedSystems*). Absorbancję zmierzono przy długości fali 450 nm za pomocą czytnika mikropłytek ELISA *LabSystems Multiscan RC* i przeliczono na stężenie za pomocą oprogramowania *GENESIS*.

Stężenie białka całkowitego w surowicy oznaczono metodą biuretową przy zastosowaniu odczynników firmy *BioSystems*. Absorbancję próby wzorcowej oraz prób badanych odczytano za pomocą spektrofotometru firmy *BioSystems*.

Analizę statystyczną otrzymanych wyników badań przeprowadzono testem nieparametrycznym ANOVA *Friedmana* dla określenia zmian w serii pomiarów, oraz za pomocą testu kolejności par *Wilcoxon*, w celu porównania stężenia badanych parametrów z próbką surowicy przechowywaną w temperaturze –70°C, traktowaną jako próbka odniesienia. Za statystycznie istotne przyjęto $p \leq 0,05$.

WYNIKI

Stężenie białka całkowitego w badanych próbkach surowicy przedstawiono w tabeli 1. Zaobserwowano, że stężenie białka całkowitego w próbkach surowicy przechowywanych przez 4 miesiące w różnych temperaturach było podobne (rys. 1).

Stężenie IL-13 w badanych próbkach surowicy przedstawiono w tabeli 2. Zauważono, że stężenie IL-13 w badanych próbkach surowicy różniło się znamienne w zależności od temperatury ich przechowywania (rys. 2). Stężenie IL-13 było najwyższe w próbkach przechowywanych w stanie głębokiego zamrożenia, a najniższe w tych próbkach, które były pozostawione w lodówce przez cały okres trwania eksperymentu.

Stężenie IL-13 w próbkach badanych przeliczono na 1 g białka całkowitego w badanych próbkach surowicy (tab. 3). Zaobserwowano, że stężenie IL-13 w przeliczeniu na gram białka całkowitego w badanych próbkach surowicy różniło się znamienne w zależności od temperatury przechowywania (rys. 3). Najwyższe stężenie IL-13 w przeliczeniu na 1 g białka całkowitego zaobserwowano w próbkach przechowywanych w temperaturze -70°C , najniższe zaś w próbkach przechowywanych w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, przez cały czas trwania doświadczenia.

W badanych próbkach surowicy stężenie IL-13 przechowywanej w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$ przez 4 miesiące, 2 tygodnie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze -70°C oraz przechowywanej przez ten czas w temperaturze -20°C porównano ze stężeniem IL-13 w surowicy przechowywanej w temperaturze -70°C od momentu odwirowania materiału. Próbkę tę potraktowano jako próbkę odniesienia (tab. 4). Zaobserwowano, że stężenie IL-13 w surowicy krwi przechowywanej w lodówce było znamienne niższe niż w surowicy przechowywanej w temperaturze -70°C . Ubytek IL-13 w tych warunkach wynosił 54% w stosunku do próbki odniesienia (rys. 4). Stężenie IL-13 w próbkach przechowywanych w lodówce przez 2 tygodnie, a następnie zamrożonych w temperaturze -70°C było znamienne niższe niż w próbkach surowicy przechowywanej w temperaturze -70°C przez cały czas trwania doświadczenia. Utrata IL-13 w tych warunkach wynosiła 43% w stosunku do próbki odniesienia (rys. 4). Stężenie IL-13 w próbkach przechowywanych w temperaturze -20°C przez cały czas trwania eksperymentu było znamienne niższe niż w próbkach surowicy przechowywanej przez ten czas w temperaturze -70°C . Ubytek IL-13 w tych warunkach wynosił 41,4% w stosunku do próbki przechowywanej w stanie głębokiego zamrożenia przez cały czas trwania eksperymentu (rys. 4).

Tabela 1. Stężenie białka całkowitego w surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach

Próbka	Średnia [g/ml] \pm SD
A	0,0714 \pm 0,008
B	0,0695 \pm 0,007
C	0,0721 \pm 0,009
D	0,0709 \pm 0,008

A – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$
 B – próbka przechowywana 2 tygodnie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze -70°C
 C – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -20°C
 D – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -70°C

Tabela 2. Stężenie IL-13 w surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach

Próbka	Średnia [pg/ml] \pm SD
A	1,3 \pm 0,9
B	1,6 \pm 1,1
C	1,6 \pm 1,1
D	2,8 \pm 2,3

A – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$
 B – próbka przechowywana 2 tygodnie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze -70°C
 C – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -20°C
 D – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -70°C

Tabela 3. Stężenie IL-13 w przeliczeniu na 1 g białka w badanych próbkach surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach

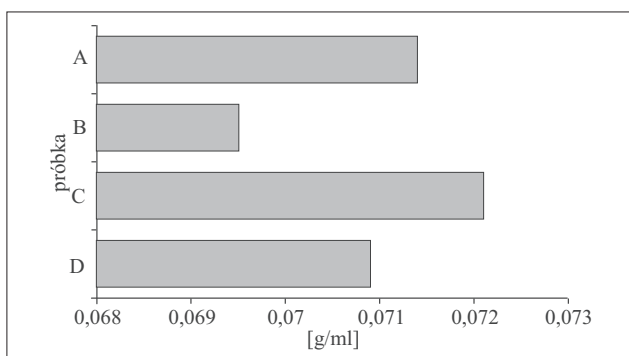
Próbka	Średnia [pg/1g białka] \pm SD
A	18,0 \pm 13,5
B	23,1 \pm 16,8
C	22,8 \pm 16,0
D	39,8 \pm 32,7

A – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$
 B – próbka przechowywana 2 tygodnie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze -70°C
 C – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -20°C
 D – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -70°C

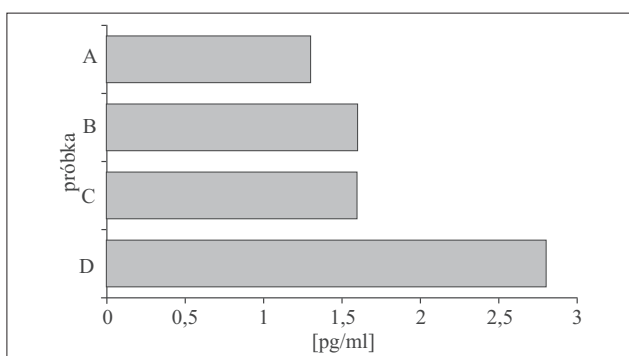
Tabela 4. Porównanie stężenia IL-13 w badanych próbkach surowicy (A, B, C) oraz w próbce odniesienia przechowywanej w temperaturze -70°C (D)

Próbka	Średnia [pg/ml] \pm SD	p
A	1,3 \pm 0,9	$\leq 0,0001$
B	1,6 \pm 1,1	$\leq 0,0001$
C	1,6 \pm 1,1	$\leq 0,0001$
D	2,8 \pm 2,3	–

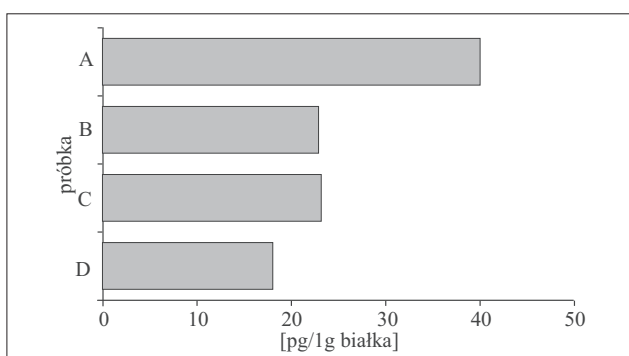
A – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$
 B – próbka przechowywana 2 tygodnie w temperaturze $2-8^{\circ}\text{C}$, a następnie do 4 miesięcy w temperaturze -70°C
 C – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -20°C
 D – próbka przechowywana 4 miesiące w temperaturze -70°C – próbka odniesienia



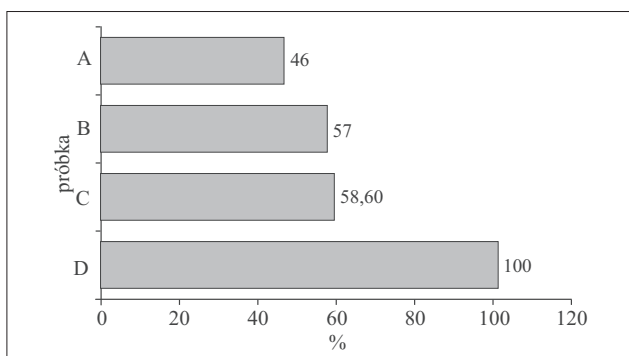
Rys. 1. Stężenie białka całkowitego w surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach ($p \leq 0,06$)



Rys. 2. Stężenie IL-13 w surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach ($p \leq 0,00001$)



Rys. 3. Stężenie IL-13 w przeliczeniu na 1 g białka w surowicy przechowywanej przez 4 miesiące w różnych temperaturach ($p \leq 0,00001$)



Rys. 4. Procentowa pozostałość IL-13 w próbkach surowicy przechowywanych w różnych warunkach w odniesieniu do próbki zamrożonej w temperaturze -70°C przez cały czas trwania eksperymentu, traktowanej jako 100%

OMÓWIENIE

Oznaczanie stężenia cytokin w różnych materiałach biologicznych jest aktualnie wykorzystywane nie tylko w celach badawczych, lecz także coraz częściej bywa przydatne dla potrzeb diagnostycznych i terapeutycznych. Oznaczenia stężenia wielu nietypowych markerów wykonywane są metodami wymagającymi zgromadzenia większej partii materiału, zarówno ze względu na specyfikę stosowanych testów, jak i ekonomiczne wykonanie badań. Z tego względu niejednokrotnie zachodzi konieczność ustalenia optymalnych warunków przechowywania surowicy krwi oraz innych materiałów biologicznych tak, aby stężenie cytokin w badanym materiale nie uległo znaczącej zmianie nawet przez okres kilku miesięcy od momentu pobrania do wykonania oznaczeń.

Jak dotąd stosunkowo dobrze określono wpływ temperatury przechowywania próbek materiału biologicznego na stężenie niewielkiej liczby cytokin, w tym m.in. IL-6, IL-10 oraz TNF- α . Z badań tych wynika, że różne cytokiny charakteryzują się różną stabilnością ściśle zależną od warunków przechowywania pobranego materiału i nie jest możliwe zastosowanie tych samych standardów względem różnych interleukin. Jak wynika z badań Kenis i wsp. [8] oraz Flower i wsp. [9] IL-6 należy do cytokin stabilnych w różnych warunkach temperatury i jest niewrażliwa na naprzemienne cykle rozmrażania i zamrażania materiału biologicznego. Natomiast w innych badaniach Flower i wsp. [9] zaobserwowali, że IL-10 można zaliczyć do cytokin mało stabilnych i wrażliwych na następujące po sobie kilkukrotne cykle naprzemiennego rozmrażania i zamrażania materiału.

Dane podawane w ulotkach informacyjnych testów ELISA przeznaczonych do oznaczania IL-13 w różnym materiale biologicznym są niejednoznaczne. W materiałach informacyjnych firmy Bender MedSystems zalecane jest jak najszybsze oddzielenie surowicy lub osocza od krwinek [10]. Tak przygotowane próbki mogą być przechowywane w lodówce do 24 godzin. Jeśli czas gromadzenia materiału jest dłuższy, należy go zamrozić w temperaturze -20°C . Według danych firmy pięciokrotne naprzemienne zamrażanie i rozmrażanie próbek nie wpływa znacząco na spadek poziomu IL-13 w surowicy badanej [10]. Materiały informacyjne firmy Thermo Scientific [11] również podają, że próbki surowicy przeznaczonej do oznaczania IL-13 mogą być przechowywane w lodówce do 24 godzin od pobrania, bez znaczącego wpływu na stężenie tej cytokiny w materiale badanym. Jednakże w przypadku konieczności dłuższego przechowywania surowicy

wymagane jest zamrożenie materiału w temperaturze -70°C [11]. Zaleca się także całkowitego unikania naprzemiennych cykli rozmrażania i zamrażania materiału [1]. Z kolei firma Enzo Life Sciences zaleca w swoich materiałach, aby próbki osocza przeznaczone do oznaczania IL-13 zamrozić w -20°C natychmiast po pobraniu oraz unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania materiału [12]. Zalecenia załączone do testu Pelikine Compact Human IL-13 ELISA Kit dopuszczają przechowywanie przygotowanej surowicy w temperaturze $4-8^{\circ}\text{C}$ do 24 godzin od pobrania. Natomiast w przypadku, gdyby materiał miał być gromadzony dłużej niż dobę, konieczne jest zamrożenie pobranych próbek w temperaturze niższej niż -18°C . Według materiałów informacyjnych tego testu trzy cykle naprzemiennego zamrażania i rozmrażania surowicy nie mają wpływu na stężenie IL-13 oznaczone w tym materiale [13]. Firma Uscn Life Science Inc. Wuhan zaleca przechowywanie próbek krwi 2 godziny w temperaturze pokojowej lub przez całą noc w lodówce przed odwirowaniem, po odwirowaniu zaś zamrożenie próbek surowicy w temperaturze od -20°C do -80°C , jeśli nie jest możliwe natychmiastowe wykonanie badania. Natomiast próbki krwi pobranej z dodatkiem EDTA zaleca odwirować w ciągu 30 minut od pobrania, a następnie zamrozić tak, jak próbki surowicy. Bez względu na nakazuje unikać kilkukrotnego zamrażania i rozmrażania materiału przed oznaczeniem IL-13 [14]. Firmy ABCam oraz Sino Biological Inc. w ogóle nie dają żadnych zaleceń dotyczących przygotowania materiału do badania oraz wpływu jego przechowywania lub naprzemiennego zamrażania i rozmrażania na stężenie IL-13 [15, 16].

Łatwo można zauważyć, że większość producentów jest w miarę zgodna co do przechowywania próbek surowicy lub osocza w lodówce do 24 godzin. Jeśli chodzi zaś o długotrwałe przechowywanie materiału, to widoczne są znaczne rozbieżności dotyczące temperatury pozwalającej na gromadzenie materiału bez ryzyka utraty znajdującej się w nim IL-13. Podobnie nie ma jednoznacznej odpowiedzi na pytanie, czy można tę cytokinę oznaczyć, gdy dysponuje się materiałem już rozmrożonym i ponownie zamrożonym. Z dyskutowanej pracy wynika jednak, że długoterminowe przechowywanie próbek materiału badanego wymaga zamrożenia ich do temperatury -70°C . Znamienne niższe stężenie IL-13 w surowicy zaobserwowano bowiem zarówno w tych próbkach, które przechowywano w lodówce, jak i tych, które zamrożono w temperaturze -20°C bezpośrednio po odwirowaniu krwi w porównaniu do stężenia IL-13 w tych próbkach materiału, które przechowywano w stanie głębokiego zamrożenia przez cały czas trwania eksperymentu.

WNIOSKI

Długoterminowe przechowywanie surowicy w celu oznaczania stężenia IL-13 wymaga zamrożenia próbek badanych w temperaturze -70°C bezpośrednio po odwirowaniu wykrzepionej krwi i przechowywania ich w stanie głębokiego zamrożenia do czasu wykonania badania.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Gołąb J, Jakóbsiak M, Lasek W. Immunologia. PWN, Warszawa 2005.
- [2] Robak T. Biologia i farmakologia cytokin. PWN, Warszawa 1995.
- [3] Kowalski ML. Immunologia kliniczna. MEDITON Oficyna Wydawnicza, Łódź 2000.
- [4] Opal SM, DePaolo VA. Anti-Inflammatory Cytokines. Chest 2000; 117: 1162–1172.
- [5] van den Berg WB. The role of cytokines and growth factors in cartilage destruction in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. Z Rheumatol 1999; 58: 136–141.
- [6] van den Berg WB. Joint inflammation and cartilage destruction may occur uncoupled. Springer Semin Immunopathol 1998; 20: 149–164.
- [7] Malemud CJ. Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. BioDrugs 2004; 18: 23–35.
- [8] Kenis G, Teunissen C, de Jongh R et al. Stability of IL-6, soluble IL-6 Receptor, IL-10 and CC16 in human serum. Cytokine 2002; 19: 228–235.
- [9] Flower L, Ahuja RH, Humphries SE et al. Effects of sample handling on the stability of interleukin 6, tumor necrosis factor- α and leptin. Cytokine 2000; 12: 1712–1716.
- [10] Bender MedSystems Human IL-13 Platinum ELISA BMS231/3 / BMS231/3TEN, http://bendermedsystems.neu.instant.at/bm_products/MAN/231-3.pdf (dostęp: 21.06.2011).
- [11] Thermo scientific Human IL-13 ELISA Kit, <http://www.piercenet.com/files/1380as8.pdf> (dostęp: 21.06.2011).
- [12] Enzo Life Sciences IL-13 (human), EIA kit, <http://www.enzolifesciences.com/fileadmin/files/manual/ADI-900-208.pdf> (dostęp: 21.06.2011).
- [13] PeliKine Compact human IL-13 ELISA kit, <http://www.sanquin.pl/datasheet/m1913.pdf> (dostęp: 21.06.2011).
- [14] Uscn Life Science Inc. Wuhan ELISA Kit for Human Interleukin 13 (IL13), <http://www.uscnk.com/pdf/2009123154653.pdf> (dostęp: 21.06.2011).
- [15] ABCam ab100553 IL13 Human ELISA Kit, <http://www.abcam.com/ps/products/100/ab100553/documents/IL13-Human-ELISA-Kit-ab100553-protocol-plain.pdf> (dostęp: 21.06.2011).

[16] Sino Biological Inc. Human IL13RA1 ELISA kit (CD213a1), <http://www.sinobiological.com/PDF/SEK10943.pdf> (dostęp: 21.06.2011).

Adres do korespondencji:

dr n. med. Kinga Lis
Katedra i Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej
85-094 Bydgoszcz, ul. M. Skłodowskiej-Curie 9
e-mail: kzlis@gazeta.pl
tel.: +48 525 854 046, fax: +4852 585 36 03