



UNIWERSYTET JAGIELLOŃSKI  
W KRAKOWIE

WYDZIAŁ BIOCHEMII, BIOFIZYKI I BIOTECHNOLOGII

Dr hab. n. med. Ewa Zuba-Surma, Prof. UJ  
Zakład Biologii Komórki  
Wydział Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii  
Uniwersytet Jagielloński  
ul. Gronostajowa 7  
30-387 Kraków  
e-mail: ewa.zuba-surma@uj.edu.pl

Kraków, 2 października 2018r.

**RECENZJA**

**rozprawy doktorskiej mgr Sylwii Dąbrowskiej**

**pt. „Analiza właściwości immunomodulacyjnych ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych szpiku kostnego i pochodzących z nich zewnątrzkomórkowych pęcherzyków przeszczepianych w modelu cytotoksycznego uszkodzenia mózgu u szczura”**

wykonanej pod kierunkiem Prof. dr hab. Barbary Łukomskiej  
w Zakładzie Neurobiologii Naprawczej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej PAN  
w Warszawie.

Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (z ang. *extracellular vesicles*; *EVs*) wydzielane przez komórki, w tym m.in. komórki zwierzęce i ludzkie, stanowią istotny element komunikacji międzykomórkowej i w ostatnich latach są istotnym przedmiotem badań wielu zespołów na świecie. Szczególnie EVs wydzielane przez komórki macierzyste (KM) stanowią przedmiot zainteresowania ze względu na przenoszoną przez nie bioaktywną zawartość molekularną, która może odgrywać istotną rolę w regulacji fenotypu oraz funkcji innych komórek, w tym terminalnie zróżnicowanych komórek somatycznych rezydujących nie tylko w prawidłowych niszach, ale również w miejscu uszkodzenia tkankowego. Wzrasta zatem zainteresowanie potencjalnymi zastosowaniami EVs pochodzących z KM - w regeneracji tkanek, co stanowi dziś nowy i prężnie rozwijający się obszar badań biomedycznych. Praca doktorska Pani mgr Sylwii Dąbrowskiej w pełni wpisuje się w ten ważny nurt badań, koncentrując się na ocenie aktywności biologicznej pęcherzyków zewnątrzkomórkowych pochodzących z ludzkich mezenchymalnych komórek macierzystych (MSCs) szpiku kostnego, w tym na zbadaniu ich właściwości immunomodulacyjnych oraz regeneracyjnych w warunkach niedokrwienego uszkodzenia mózgu *in vivo*.

## **Formalny opis rozprawy**

Przedstawiona mi do oceny praca doktorska liczy 121 stron i zachowuje układ typowy dla rozpraw doktorskich. Rozprawa rozpoczyna się od *Spisu treści*, po którym następują trzystronicowe *Streszczenie* pracy w języku polskim (uzupełnione dodatkowymi dwoma rycinami) oraz dwustronicowy abstrakt w języku angielskim oraz *Wykaz skrótów*. Następnie w pracy umieszczono *Przegląd Piśmiennictwa*, będący merytorycznym wstępem do podejmowanych w pracy aspektów badawczych. Rozdział ten liczy 32 strony maszynopisu i został podzielony na 6 głównych podrozdziałów, zaopatrzonych w 5 rycin ilustrujących omawiane zagadnienia. W kolejnym, dwustronicowym rozdziale zatytułowanym *Założenia i cele pracy*, Doktorantka formułuje najważniejsze cele badawcze swojej pracy doktorskiej w kontekście dotychczasowej wiedzy oraz ograniczeń związanych z terapiami uszkodzeń OUN. Kolejny jednostronicowy rozdział *Materiał* obejmuje opis materiału biologicznego stosowanego w badaniach oraz opis grup eksperymentalnych w przedklinicznych badaniach *in vivo*, po którym następuje rozdział *Metody badań* (8 stron) zaopatrzony w 2 ryciny oraz 2 tabele. Rozdział *Wyniki* liczy 26 stron, na których umieszczono 34 złożone ryciny oraz 2 tabele. Kolejno w pracy umieszczono 11-o stronicową *Dyskusję* opisanych wcześniej wyników na tle dotychczasowych doniesień naukowych, których spis umieszczono w dalszym rozdziale *Spis piśmiennictwa* (na końcu rozprawy). Po dyskusji umieszczono rozdziały *Podsumowanie* oraz *Wnioski*, gdzie na 1 stronie w punktach podsumowano najważniejsze osiągnięcia pracy doktorskiej

Przedstawiona do oceny praca doktorska spełnia w pełni wymogi formalne rozprawy doktorskiej.

## **Ocena merytoryczna**

*Streszczenie* pracy, przygotowane zarówno w języku polskim, jak i angielskim, umieszczone na początku rozprawy, zostało przygotowane przez Doktorantkę bardzo starannie; jest informatywne i w sposób wyczerpujący przedstawia uzasadnienie oraz zakres rozprawy doktorskiej. Dodatkowo Doktorantka wymieniła w punktach aspekty innowacyjności jej rozprawy doktorskiej.

W rozdziale *Przegląd piśmiennictwa* będącym *de facto* wstępem do pracy, Doktorantka przedstawiła dobrze dobrany zestaw informacji ułatwiający czytelnikowi zrozumienie celów oraz znaczenia badań podejmowanych w całości rozprawy doktorskiej. Doktorantka w sposób systematyczny i wyczerpujący omawia zagadnienia dotyczące patofizjologii niedokrwiennego uszkodzenia mózgu, a następnie płynnie przechodzi do przedstawienia procesów zapalnych oraz aktywacji układu immunologicznego towarzyszących takiemu uszkodzeniu. Doktorantka w sposób bardzo dokładny i uporządkowany omawia udział poszczególnych elementów układu

immunologicznego, w tym komórek immunokompetentnych i wydzielanych mediatorów zapalenia, w przebiegu stanu zapalnego towarzyszącego niedokrwinnemu uszkodzeniu mózgu. Na szczególne podkreślenie zasługuje dalsza część wstępu, w której Doktorantka starannie opisuje historię badań, fenotyp i właściwości biologiczne komórek MSCs oraz mikropęcherzyków zewnątrzkomórkowych (w szczególności z komórek MSCs), w tym w sposób systematyczny przedstawia efekty ich immunomodulacyjnego działania na różne komponenty komórkowe układu odporności. W mojej ocenie jest to bardzo dobre kompendium wiedzy na temat immunomodulacyjnej aktywności komórek MSCs oraz EVs w miejscu uszkodzenia tkankowego i z pewnością wymagało od Doktorantki kompleksowego i szerokiego spojrzenia na literaturę badawczą w tym zakresie. Tę część wstępu Doktorantka wzbogaciła także w trzy bardzo staranne i informatywne ryciny, ilustrujące informacje opisane w tekście (Ryc. 2, 3 i 4). Ostatnią część wstępu stanowią informacje odnośnie eksperymentalnych i klinicznych prób zastosowania komórek MSCs oraz EVs w terapii uszkodzeń niedokrwiniennych mózgu, co stanowi istotne bezpośrednie wprowadzenie do celów pracy.

Podsumowując, *Wstęp* jest przygotowany w mojej ocenie bardzo starannie i wyczerpująco w kontekście dotychczasowego stanu wiedzy - o czym świadczą odpowiednie odnośniki do publikacji naukowych - oraz w sposób logiczny wprowadza czytelnika w hipotezy badawcze oraz cele, jakie doktorantka postawiła sobie w swojej pracy doktorskiej. Niewątpliwie stanowi on mocną część całej rozprawy.

Do tej części pracy mam nieliczne uwagi oraz pytania inspirowane ciekawością naukową, w tym następujące:

- w niektórych miejscach pracy przy krytycznych informacjach merytorycznych brak odniesienia do referencji w literaturze (np. str. 10, 14, 16);
- zastrzeżenie budzi użyta w kilku miejscach (np. str. 24) forma "zewnątrzkomórkowe pęcherzyki", którą ze względu na składnię języka polskiego byłoby lepiej zastąpić raczej określeniem "pęcherzyki zewnątrzkomórkowe".
- na str. 18, Doktorantka wskazuje antygen Sca-1, jako jeden z markerów komórek MSCs. Zastrzeżenie jest takie, że jest to antygen myszy, a zatem nie występuje na komórkach MSCs pochodzenia ludzkiego.
- na str. 15. Doktorantka pisze o roli chemokiny CXCL12 (SDF-1) w procesach rekrutacji leukocytów w miejsce uszkodzenia. Wskazuje także na opisywany w literaturze, udział tej chemokiny w aktywacji neuro- i angiogenezy, a także o jej aktywności cytoprotekcyjnej względem nowopowstałych neuronów.

Doktorantka nie wspomina natomiast o istotnej roli SDF-1 w mobilizacji komórek macierzystych z innych nisz tkankowych (np. szpiku kostnego) i ich rekrutacji do miejsca uszkodzenia, co może mieć istotne znaczenie w regeneracji. Czy Doktorantce coś wiadomo na temat udziału zmobilizowanych i zrekrutowanych KM w tkance mózgowej po udarze lub w innych uszkodzeniach CUN?

- W części opisującej przebieg niedokrwienia mózgu (str. 9) Doktorantka pisze o obszarze "ischemicznego rdzenia" oraz "ischemicznego półcienia", jako dwóch obszarach różniących się stopniem niedotlenienia, ale również uszkodzenia komórkowego w OUN. Te bardzo interesujące informacje stymulują mnie do zadania Doktorantce pytania, czy można obszar metabolicznego "ischemicznego półcienia" w OUN porównać do tzw. "hibernowanego miokardium" opisywanego w stanach niedokrwiennego uszkodzenia mięśnia sercowego? Czy według Doktorantki możliwe i zasadne byłoby poszukiwanie wspólnych podejść w (szeroko rozumianych) terapiach regeneracyjnych po udarze mózgu oraz po zawale mięśnia sercowego?

- We wstępie Doktorantka pisze również o ważnej roli komórek mikrogleju w modulowaniu odpowiedzi immunologicznej, wskazując m.in. na przeciwstawne działanie komórek typu M1 i M2 (str. 10). Wskazuje także na fagocytozę neutrofili przez komórki mikrogleju, jako jeden z potencjalnych ważnych procesów ograniczających uszkodzenia wywołane niedokrwieniem (str. 11). Tu pojawia się znów moja ciekawość i pytanie do dyskusji: Które komórki mikrogleju są wskazywane, jako populacja uczestnicząca w fagocytozie neutrofili? Czy według Doktorantki można w jakiś sposób modulować, bądź stymulować ten proces, wpływając tym samym na zahamowanie stanu zapalnego w miejscu uszkodzenia, a co za tym idzie - działając proregeneracyjnie?

Myślę, że odpowiedzi na te pytania będą ciekawym wstępem do dyskusji nad pracą w czasie jej obrony.

*Założenia i cel pracy* zostały sformułowane jasno oraz przedstawione i dobrze uzasadnione w kontekście wiedzy omówionej we wprowadzeniu.

W części *Materiał* umieszczono opis materiału biologicznego stosowanego w badaniach, który to stanowiły ludzkie komórki macierzyste mezenchymalne (MSCs) ze szpiku kostnego oraz umieszczono opis grup zwierząt eksperymentalnych użytych w przedklinicznych badaniach *in vivo*. Tę część uzupełniono schematem doświadczenia na zwierzętach. Ta część jest napisana jasno i informatywnie.

W sekcji *Metody badań* Doktorantka w sposób dokładny i wyczerpujący opisała procedury eksperymentalne zastosowane w pracy doświadczalnej, w pełni pozwalające na odtworzenie

przeprowadzonych eksperymentów. Na podkreślnie zasługuje fakt, że Doktorantka zastosowała w swojej pracy liczne unikatowe metody i techniki dedykowane analizie nanocząstek biologicznych, co wymagało od niej szeregu optymalizacji metodycznych oraz nowego podejścia w analizie mikropęcherzyków komórkowych - różnego, od tego, które jest powszechnie stosowane w klasycznych badaniach komórkowych.

Do nielicznych moich uwag do tej części pracy należą:

- na str. 44 (Opis hodowli komórek oraz izolacji EVs) – Brak informacji bardziej szczegółowych odnośnie pożywki, w której hodowane były MSCs (np. czy zawierała surowicę, czy była wcześniej ultrawirowana, itp.), które to szczegóły są kluczowe dla dalszej preparatyki i właściwości EVs.
- na str. 44-45 (Opis procedur izolacji EVs) – Podobnie jak wyżej - ze względu na istotny wpływ na skład pozyskiwanych ultrawirowanych frakcji EVs, byłoby mile widziane podanie dokładnej nazwy stosowanej ultrawirówki oraz rodzaju rotora użytego do preparatyki.
- na str. 44 i 45, gdzie Doktorantka podaje opis barwienia komórek oraz EVs barwnikiem PKH26, byłoby stosowniej podać końcowe stężenie/a stosowanego znacznika zamiast liczby dodawanych mikrolitrów, zwłaszcza, że Doktorantka nie podaje wyjściowego stężenia odczynnika, ani końcowej objętości próbki.
- na str. 46 (i również w innych miejscach pracy) Doktorantka używa określenia „migracja” EVs w odniesieniu *de facto* do ich „internalizacji” przez komórki targetowe. Z punktu widzenia biologa komórki, jest to niewłaściwe określenie, którego doktorantka powinna unikać mówiąc o EVs, ponieważ pęcherzyki - jako obiekty „martwe”, nie mają aktywnej zdolności migracyjnej. Należałoby zatem raczej stosować termin „internalizacja” w odniesieniu do badanych w pracy procesów oddziaływania i pobierania EVs przez komórki docelowe do ich wnętrza.

Wyniki rozprawy zostały zaprezentowane w 26-o stronicowym rozdziale *Wyniki*, podzielonym na 13 podrozdziałów. Doktorantka w sposób logiczny i uporządkowany przedstawiła główne osiągnięcia swoich badań. Wyniki zostały opisane w sposób zrozumiały i usystematyzowany oraz zostały zilustrowane odpowiednimi, dobrze opisanymi wielopanelowymi rycinami i tabelami (odpowiednio, 34 ryciny oraz 2 tabele).

W pierwszej części Doktorantka skoncentrowała się na charakterystyce ludzkich komórek MSCs szpiku kostnego, które stosowała w pracy - na poziomie ich fenotypu wieloantygenowego oraz

ultrastruktury - wykorzystując w tym celu m.in. techniki bazujące o mikroskopię fluorescencyjną konfokalną oraz elektronową (TEM). W następnej części scharakteryzowała pozyskane z tych komórek pęcherzyki zewnątrzkomórowe, określając ich wielkość oraz profil wieloantygenowy, a także potwierdzając ich kulistą, integralną strukturę. Doktorantka wykazała także skuteczność znakowania EVs preprataami m.in zawierającymi cząstki żelaza – zgodnie z procedurami znakowania, które opracowała w ramach swoich badań, a co miało istotne znaczenia w dalszej części pracy. W tej części badań, Doktorantka zastosowała szereg specjalistycznych technik, w tym dedykowanych analizom nanocząstek, jak m.in. system NanoSight oraz wysokorozdzielczą cytometrię przepływową. W dalszej części pracy Doktorantka potwierdziła internalizację MSC-EVs przez komórki docelowe *in vitro*, aby dalej przejść do szeregu badań w warunkach *in vivo*, gdzie w szczurzym modelu uszkodzenia mózgu podawała znakowane komórki MSCs oraz ich EVs w celu ich dalszego zobrazowania w uszkodzonych tkankach po przeszczepie oraz oceny ich immunomodulacyjnego działania w tych tkankach. Należy tu podkreślić wkład Doktorantki w opracowanie protokołów anakowania komórek oraz EVs w celu ich późniejszego obrazowania w tkankach. W celu obrazowania przeszczepionych komórek MSCs, Doktorantka zastosowała zarówno przyżyciową metodę MRI, jak i metody immunohistochemiczne wykrywające przeszczepione komórki w tkankach *post mortem*. Doktorantka wykazała obecność takich komórek w mózgu do 7 dnia po przeszczepie, co potwierdza ich szybkie usówanie z tkanek i udział w procesach regeneracji i immunomodulacji głównie poprzez działanie parakryne w miejscu przeszczepienia. Zostało to dalej potwierdzone w pracy obserwacjami m.in. obniżonej liczby astrocytów oraz komórek mikrogleju w miejscu uszkodzenia u zwierząt po podaniu komórek MSCs lub MSC-EVs, w porównaniu do zwierząt kontrolnych (tj. z uszkodzeniem, ale bez przeszczepu). W tkankach zwierząt po przeszczepie komórek MSCs lub EVs, Doktorantka zaobserwowała również zmniejszoną liczbę CD45+ leukocytów (w tym neutrofilii) infiltrujących uszkodzone tkanki, co może świadczyć o pozytywnym wpływie przeszczepionych obiektów na wyciszenie stanu zapalnego w uszkodzonej tkance, co w efekcie może mieć efekt cytoprotekcyjny i pro-regeneracyjny. W ostatniej części tego rozdziału, Doktorantka przedstawiła wyniki dotyczące poziomu wybranych cytokin prozapalnych i anyzapalnych w tkance mózgowej zwierząt, u których przeszczepiono komórki MSCs lub MSC-EVs, w porównaniu zarówno do zwierząt zdrowych, jak i poddanych niedotlenieniu, ale które nie otrzymały przeszczepu. Doktorantka wykazała zmiany w poziomie kluczowych cytokin oraz chemokin - po podaniu MSCs lub MSC-EVs (w porównaniu z kontrolą po samej ischemii), potwierdzające immunomodulacyjny efekt przeszczepu w tkance mózgowej, w tym: obniżony poziom IL-1 $\alpha$  (szczególnie w pierwszych dniach po przeszczepie), IL-1 $\beta$ , IL-6 oraz chemokin CXCL1, MIP-1 $\alpha$  i MIP-1 $\beta$ .



Generalnie, wyniki badań zostały przedstawione w sposób logiczny i spójny. Na podkreślenie zasługuje fakt, że część wyników Doktorantki zostało już opublikowanych w dwóch wysokoimpaktowanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym, a także zostało umieszczone w artykule będącym w recencji oraz zostało objęte zgłoszeniem patentowym, co potwierdza wysoką jakość oraz nowatorski aspekt prowadzonych badań, a także ich znaczenie praktyczne.

Do tej części pracy mam następujące drobne uwagi oraz uwagi:

- W eksperymencie oceniającym stopień internalizacji MSC-EVs przez komórki docelowe, Doktorantka użyła jako komórek tergetowych komórek BM-MSCs, które równocześnie były komórkami, z których te pęcherzyki pochodziły. Co było powodem takiego wyboru modelu komórki docelowej w badaniach *in vitro*? Czy według Doktorantki - w kontekście nadrzędnego celu pracy, czyli zastosowania MSC-EVs w uszkodzonej tkance mózgowej - nie byłoby bardziej zasadnym zbadać ich internalizację przez komórki modelowe astrocytów lub komórek glejowych, a nawet interakcje MSC-EVs z leukocytami krwi ludzkiej? Czy Doktorantka podejmowała takie próby *in vitro*?

- Jak Doktorantka może wytłumaczyć brak istotnego wpływu przeszczepionych preparatów komórek MSCs oraz MSC-EVs na poziom kluczowej cytokiny antyzapalnej, jaką jest IL-10, w tkance mózgowej? Czy zatem zmiany w poziomie ekspresji innych cytokin mogą mieć istotniejsze znaczenie w obserwowanych efektach?

Chciałabym w tym miejscu zachęcić Doktorantkę do przygotowania schematu podsumowującego najistotniejsze obserwacje dotyczące immunomodulacyjnego wpływu komórek MSCs oraz EVs, które zaobserwowała w swojej pracy. Taki schemat, na którym znalazłyby się najistotniejsze komponenty komórkowe i humoralne, które ulegały zmianie pod wpływem przeszczepionych MSCs i EVs, Doktorantka mogłaby przedstawić w czasie swojej obrony – wskazując jednocześnie na te czynniki, które szczególnie ulegają zmianie w tkance mózgowej dzięki działaniu komórek MSCs i MSC-EVs.

- drobna uwaga: W opisie osi Y wykresów na Rycinach 22-28, Doktorantka podaje „[%]” bez doprecyzowania czego to dotyczy. Uzupełnienie pełnego opisu osi z pewnością ułatwiłoby interpretację wyników. Myślę, że Doktorantka będzie miała okazję doprecyzować to w czasie swojej prezentacji w czasie obrony pracy.

W rozdziale *Dyskusja* autorka krytycznie ocenia własne wyniki na tle innych danych literaturowych oraz wskazuje na potencjalne obszary, gdzie wyniki uzyskane w jej pracy doktorskiej

mogą być wykorzystane w przyszłości. Dyskusja jest napisana starannie i wskazuje na znajomość tematu.

Rozprawę kończą krótkie rozdziały *Podsumowanie* oraz *Wnioski*, w których Doktorantka przedstawiła w punktach główne osiągnięcia badawcze oraz konkluzje płynące z przeprowadzonych przez nią badań, które z pewnością mają charakter nowatorski i mogą mieć istotne znaczenia dla opracowania przyszłych terapii regeneracyjnych.

W tym miejscu nasuwa mi się jedynie drobna uwaga. W części podsumowującej, Doktorantka wymienia, jako jedno ze swoich osiągnięć - opracowanie metody izolacji EVs z ludzkich komórek MSCs, która to metoda umożliwia pozyskiwanie „czystej” populacji EVs pozbawionej fragmentów komórkowych. Jednakże w pracy Doktorantka nie poświęciła temu zagadnieniu optymalizacji metody pozyskiwania EVs zbyt wiele miejsca. Być może tego typu działania znalazły się na etapie optymalizacji jej prac badawczych i dlatego nie są rozbudowane w pracy, jednakże jeśli Doktorantka zdecydowała się umieścić taki wniosek w podsumowaniu głównych osiągnięć pracy, to wskazane byłoby rozwinięcie tego aspektu. Myślę, że w czasie obrony swojej pracy, Doktorantka będzie miała okazję przedstawienia w jaki sposób jej protokoły zostały zoptymalizowane w porównaniu z już istniejącymi procedurami pozyskiwania MSC-EVs z zastosowaniem metody wirowania sekwencyjnego.

### **Ocena edytorskiej strony rozprawy**

Pod względem edytorskim praca doktorska jest przygotowana starannie. W czasie czytania zwracają uwagę jedynie nieliczne, drobne błędy literowe i interpunkcyjne, w tym np. różne, przypadkowe stosowanie kropki i przecinka w ułamkach liczbowych oraz nieliczne wyrazy obce (np. „debris”, zamiast polskiego określenia „fragmenty” lub „szczątki” komórkowe). Wspomniane drobne błędy edytorskie nie umniejszają jednak w żaden sposób wysokiej jakości rozprawy.

Podsumowując, w przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej Pani mgr Sylwii Dąbrowskiej, autorka podjęła ważny i nowy temat badawczy dotyczący oceny potencjału biologicznego, a w szczególności właściwości immunomodulacyjnych ludzkich komórek macierzystych mezenchymalnych oraz ich pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, po przeszczepieniu do uszkodzonej tkanki mózgowej. Jej badania wpisują się w najnowsze trendy badawcze prowadzone dziś w zakresie terapeutycznego wykorzystania właściwości parakrynych komórek MSCs w terapiach uszkodzonych tkanek i otwierają nowe możliwości przyszłych terapii. Uzyskane wyniki przedstawione w pracy



stanowią istotny, nowatorski wkład Doktorantki w światowe badania w tym zakresie i mają duże znaczenia aplikacyjne.

Rozprawę doktorską Pani mgr Sylwii Dąbrowskiej oceniam wysoko zarówno pod względem merytorycznym, jak i formalnym i edytorskim. Przedstawione w recenzji powyższe uwagi oraz pytania w żadnym stopniu nie wpływają na jak najbardziej pozytywną ocenę całej pracy doktorskiej. Wręcz przeciwnie, świadczą o tym, że pracę czyta się z dużym zainteresowaniem, a otrzymane wyniki są zachętą do stawiania nowych pytań.

**Stwierdzam, że przedstawiona do recenzji praca spełnia wszystkie wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pani mgr Sylwii Dąbrowskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Z uwagi na dotychczasowy dorobek Doktorantki oraz nowatorskie aspekty i wysoką wartość naukową rozprawy, wnoszę o jej wyróżnienie stosowną nagrodą.**

