

Prof. dr hab. Stanisław Okrasa
Katedra Anatomii i Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 Olsztyn
ul. Oczapowskiego 1A

**Ocena rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Łapot
pt.: "Wybrane mechanizmy neuronalnej regulacji ekspresji genu *GnRH*
i genu receptora *GnRH* w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy"**

OGÓLNA CHARAKTERYSTYKA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Badania opisane w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej zostały zrealizowane w Instytucie Fizjologii i Żywienia Zwierząt (IFiZZ) im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie w latach 2005-2007, w zespole prof. dr. hab. Franciszka Przekopa. Wyniki tych badań zostały opublikowane w latach 2008-2009 w niżej wyszczególnionych pracach.

1. **Lapot M**, Ciechanowska M, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Changes in the GnRH mRNA and GnRH receptor (GnRH-R) mRNA levels in the hypothalamic-anterior pituitary unit of anestrus ewes after infusion of GnRH into the third cerebral ventricle. *Reprod Biol.* 2008;8:149-161.
2. Ciechanowska M, **Lapot M**, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Implication of dopaminergic systems on *GnRH* and *GnRH-R* genes expression in the hypothalamus and *GnRH-R* gene expression in the anterior pituitary gland of anestrus ewes. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 2008;116:357-362.
3. Ciechanowska M, **Lapot M**, Malewski T, Mateusiak K, Misztal T, Przekop F. Effects of GABA(A) receptor modulation on the expression of *GnRH* gene and GnRH receptor (*GnRH-R*) gene in the hypothalamus and *GnRH-R* gene in the anterior pituitary gland of follicular-phase ewes. *Anim Reprod Sci.* 2009;111:235-248.

Pierwotnym promotorem Doktorantki był prof. dr. hab. Franciszek Przekop, który przedstawił Radzie Naukowej IFiZZ plan realizacji doktoratu mgr Magdaleny Łapot. Wszczęcie Jej przewodu doktorskiego nastąpiło 17.06.2008 r., jednak nie doszło do obrony pracy doktorskiej w planowanym czasie. Po latach, sprawa została na nowo podjęta przez Doktorantkę i po analizie formalno-prawnej oraz spełnieniu przez Doktorantkę określonych wymagań postawionych przez Radę Naukową IFiZZ w Jabłonie, nastąpiła kontynuacja postępowania umożliwiającego mgr Magdalenie Łapot przystąpienie do obrony rozprawy doktorskiej w oparciu o wcześniej wykonane badania. W międzyczasie funkcję promotora pracy doktorskiej, za zgodą prof. dr. hab. Franciszka Przekopa i Rady Naukowej IFiZZ, przejęła dr hab. Magdalena Ciechanowska. Pragnę nadmienić, iż moja osoba została wyznaczona na recenzenta we wcześniej wszczętym przewodzie doktorskim mgr Magdaleny Łapot i ponownie zatwierdzona przez Radę Naukową IFiZZ podczas powtórnego rozpatrywania tej sprawy.

Jako recenzent pracy doktorskiej mgr Magdaleny Łapot, otrzymałem opracowanie rozprawy doktorskiej w formie maszynopisu ze stosownymi oświadczeniami Autorki i Pani Promotor dotyczącymi załączonej rozprawy oraz kopie wyżej wymienionych publikacji i oświadczenia o indywidualnym wkładzie pracy podpisane przez współautorów, odnoszące się osobno do każdej z tych publikacji. Według załączonych oświadczeń, wkład Doktorantki

w przeprowadzenie badań i przygotowanie tych publikacji był wysoki i w pierwszej publikacji stanowił 60%, a w dwóch pozostałych – po 55%. Obejmował on udział w przeprowadzeniu doświadczeń, wykonaniu analiz Real-Time PCR, opracowaniu wyników i przygotowaniu manuskryptów.

Opracowanie rozprawy doktorskiej obejmuje 101 stron maszynopisu, 19 rycin i 2 tabele. Praca zawiera typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały, tj. *Wstęp*, przedstawiający aktualny stan wiedzy w zakresie podjętego tematu badawczego, *Założenia i cel pracy*, wyszczególniający hipotezy badawcze i cele naukowe pracy, *Materiały i metody* z opisami badanych zwierząt, przeprowadzonych doświadczeń i procedur badawczych oraz *Wyniki* i *Dyskusję* zawierającą także syntetyczne podsumowanie przeprowadzonych badań, a także *Wnioski* sformułowane na podstawie uzyskanych wyników. Ponadto, opracowanie zawiera *Streszczenia* w języku polskim i angielskim, *Spis treści*, *Wykaz stosowanych skrótów* oraz zestawienie cytowanego piśmiennictwa, obejmujące 207 pozycji.

MERYTORYCZNA ANALIZA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Oceniana rozprawa doktorska dotyczy oddziaływania klasycznych układów neuronalnych – dopaminy i kwasu γ -aminomasłowego (GABA), jak również samego GnRH na ekspresję genów *GnRH* i jego receptora (*GnRHR*) u owiec anestralnych lub samic w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego. Rola różnych podwzgórzowych układów neuronalnych w regulacji aktywności systemu GnRH/LH była rozpatrywana w wielu wcześniejszych badaniach, m.in. prowadzonych przez zespół Profesora Franciszka Przekopa. Nowym aspektem tej regulacji, podjętym w rozprawie doktorskiej mgr Magdaleny Łopot, było m.in. testowanie wpływu blokowania receptora dopaminy (D2) oraz stymulacji i blokowania receptora GABA_A na poziomie molekularnym na system GnRH/GnRHR, pełniący kluczową rolę w regulacji wydzielania hormonów gonadotropowych przez przysadkę.

We *Wstępie* pracy, po podaniu podstawowych informacji dotyczących anatomii układu podwzgórze-przysadka, Autorka opisuje lokalizację systemu GnRH w ośrodkowym układzie nerwowym (OUN) i jego funkcjonowanie, uwzględniając krótką charakterystykę neuronów KNDy umiejscowionych w jądrze łukowatym (ARC), wykazujących koekspresję kisspeptyny (Kiss 1), neurokininy B (KNB) oraz dynorfiny A (DYNA). W tej części pracy, Doktorantka wyjaśnia istotę sezonowości w rozrodzie owiec oraz regulację uwalniania GnRH/LH w różnych okresach ich cyklu rozrodczego, dokonując szczegółowego przeglądu piśmiennictwa na temat wpływu układów dopaminy, GnRH i GABA na ten proces. Omawia także rolę neuronów KNDy w kontroli pulsacyjnego uwalniania GnRH/LH u owiec w różnych stanach fizjologicznych. Należy podkreślić, że opisy zamieszczone we *Wstępie* pracy stanowią dobre wprowadzenie do tematyki przeprowadzonych badań. Zostały one napisane bardzo zwięźle i przejrzysto.

W kolejnym rozdziale, po krótkim wprowadzeniu, zaprezentowano przyjęte hipotezy i cele badawcze. Doktorantka wyszła z założenia, że:

- 1) regulacja sekrecji GnRH/LH u owcy może zachodzić na poziomie molekularnym, angażując różne mechanizmy neuronalne;
- 2) podwzgórzowe neurotransmitery i neuromodulatory, dopamina i GABA, pośredniczące w estrogenowej kontroli uwalniania GnRH/LH, mogą uczestniczyć w regulacji ekspresji genów *GnRH* i *GnRHR*;
- 3) GnRH może być istotnym elementem neuronalnego mechanizmu regulującego uwalnianie GnRH/LH z układu podwzgórzowo-przysadkowego.

Przyjęte przez Doktorantkę cele badawcze obejmowały:

- 1) określanie wpływu ośrodkowego zablokowania receptorów dopaminy D2 na ekspresję genów *GnRH* i *GnRHR* w układzie podwzgórzowo-przysadkowym owcy w okresie anestrалnym;

- 2) ocenę wpływu ośrodkowej aktywacji lub blokowania receptora GABA_A na ekspresję genu *GnRH* w podwzgórzu oraz *GnRHR* w podwzgórzu i przysadce u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego;
- 3) analizę ekspresji mRNA kodującego GnRH i GnRHR po infuzji niewielkich dawek GnRH do III komory mózgu owiec anestralnych.

Badania przedstawione w rozprawie doktorskiej zostały przeprowadzone na samicach owcy rasy Merynos Polski po uzyskaniu odpowiedniego zezwolenia Lokalnej Komisji Etycznej (LKE) ds. Doświadczeń na Zwierzętach. W maszynopisie rozprawy przedstawiono krótkie opisy przeprowadzonych doświadczeń. Do blokowania receptora dopaminy D2 użyto sulpirydu w dawce 20 µg/dzień (*Doświadczenie 1*), a receptor GABA_A stymulowano muscimolem, zaś blokowano przy użyciu bikukuliny, stosując w obu przypadkach dawkę 4 µg/dzień (*Doświadczenie 3*). Egzogenne GnRH podawano w formie pięciu 20 min infuzji do III komory mózgu, stosowanych co 40 min (w godz. 8.00-13.00) przez 3 kolejne dni w dziennej dawce 0,4 µg na zwierzę. Prace laboratoryjne obejmowały określanie ekspresji mRNA kodującego GnRH i GnRHR przy użyciu techniki reakcji łańcuchowej polimerazy z analizą produktu w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR) oraz oznaczanie LH metodą podwójnych przeciwciał. Ekspresję określonych genów badano poubojowo w obszarze przedwzrostowym (POA), podwzgórzu przednim (AH) i brzuszno-przyśrodkowym (VMH), szypule/wyniosłości pośrodkowej (SME) oraz przednim płacie przysadki (AP), a w surowicy krwi obwodowej oznaczano stężenie LH. Bardzo uzasadnione i przydatne było zamieszczenie w tej części pracy zdjęcia przekroju strzałkowego mózgu owcy z zaznaczeniem struktur, w których badano ekspresję rozpatrywanych genów (Rys. 3.3). Na szczególne podkreślenie zasługuje przeprowadzenie eksperymentów w warunkach *in vivo*, które w takim przypadku wymagają wykonywania trudnych i pracochłonnych zabiegów chirurgicznych pozwalających na podawanie badanych substancji do III komory mózgu zwierząt doświadczalnych. Wysoka wartość wyników w ten sposób przeprowadzonych badań polega na tym, że stanowią one niezbędny punkt odniesienia dla badań z tego zakresu, coraz częściej wykonywanych w warunkach *in vitro*.

W kolejnej części pracy, uzyskane wyniki badań przedstawiono na 12 rycinach. Wyniki te wskazują na możliwość oddziaływania dopaminy i GABA m.in. na ekspresję genów *GnRH* i *GnRHR*, a także GnRH – na ekspresję tych genów w wybranych strukturach układu podwzgorzowo-przysadkowego u owiec. W przeprowadzonych badaniach stwierdzono:

- 1) obecność transkryptu *GnRH* w POA, AH i VMH oraz transkryptu *GnRHR* – w POA, AH, VMH, SME i AP;
- 2) po zablokowaniu receptorów D2 u owiec anestralnych:
 - obniżenie ekspresji transkryptu *GnRH* w VMH;
 - obniżenie ekspresji transkryptu *GnRHR* – w VMH i SME, a wzrost – w POA, AH i AP;
 - wzrost poziomu i częstotliwości pulsów LH we krwi obwodowej;
- 3) po podaniu egzogenego GnRH do III komory mózgu owcom anestralnym:
 - wzrost ekspresji transkryptu *GnRH* tylko w VMH oraz transkryptu *GnRHR* – w POA, AH, VMH, SME i AP;
 - wzrost poziomu i amplitudy pulsów LH (bez zmian częstotliwości);
- 4) po stymulacji receptorów GABA_A u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego:
 - obniżenie ekspresji transkryptu *GnRH* – w POA, AH i VMH oraz transkryptu *GnRHR* – w POA, AH, VMH, SME i AP;
 - obniżenie poziomu i częstotliwości pulsów LH (bez zmian amplitudy);

5) po zablokowaniu receptorów GABA_A u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego:

- wzrost ekspresji transkryptu *GnRH* – w POA, AH i VMH oraz transkryptu *GnRHR* – w POA, AH, VMH, SME i AP;
- wzrost poziomu LH (bez zmiany częstotliwości i amplitudy pulsów).

Badania Doktorantki wskazują na możliwość oddziaływania dopaminy na ekspresję genów *GnRH* i *GnRHR* w wybranych strukturach układu podwzgórzowo-przysadkowego u owiec. W następstwie zablokowania receptorów dopaminy D2 stwierdzono wzrost poziomu LH we krwi obwodowej, ale nie odnotowano istotnych zmian w ekspresji genu *GnRH* w POA i AH. Interesującą obserwacją jest także wykazanie zróżnicowanego wpływu blokowania receptorów dopaminy D2 na ekspresję genu *GnRHR* w badanych strukturach podwzgórza owcy. Oczywisty jest wzrost jej w przednim płacie przysadki, natomiast wzrost w POA i AH oraz obniżenie w VMH i SME po podaniu sulpirydu ujawniają złożoność oddziaływania dopaminy na podwzgórzowy system GnRH/GnRHR. Dodać należy, że w obszarze VMH antagonistą dopaminy oprócz hamowania ekspresji genu *GnRHR*, spowodował także znaczne obniżenie transkryptu *GnRH*. W *Dyskusji*, Doktorantka wnikliwie analizuje stwierdzone zależności, m.in. zwracając uwagę na możliwość bezpośredniego lub pośredniego działania dopaminy na neurony wykazujące ekspresję *GnRH* lub/i *GnRHR* oraz zróżnicowaną wrażliwość neuronów na dopaminę w różnych obszarach podwzgórza.

W badaniach Doktorantki, po podaniu owcom w okresie anestrалnym GnRH do III komory mózgu, wykazano wzrost ekspresji *GnRHR* we wszystkich badanych obszarach podwzgórza i przednim płacie przysadki, natomiast wzrost transkryptu *GnRH* odnotowano tylko w obszarze VMH. Szczególnie wyniki dotyczące ekspresji genu *GnRH* w warunkach tego doświadczenia są intrygujące, ponieważ w sytuacji wzrostu poziomu LH we krwi obwodowej można było spodziewać się również wzrostu transkryptu *GnRH* w POA i AH, czyli obszarach bogatych w perikariony GnRH. Jako przyczynę braku takiej reakcji, Doktorantka m.in. rozpatruje możliwość wystąpienia wzmożonego wykorzystania transkryptu *GnRH* w tych obszarach w procesie translacji (tj. biosyntezy łańcucha polipeptydowego prekursora GnRH). Słusznie Autorka zauważa, że do wyjaśnienia tej kwestii przydatne byłoby określenie poziomu GnRH we krwi podwzgórzowo-przysadkowego krążenia wrotnego. Należy także dodać, że badania Doktorantki nie potwierdziły funkcjonowania mechanizmu ultrakrótkiego ujemnego sprzężenia zwrotnego w obrębie neuronów GnRH u owiec w okresie anestrалnym, jakkolwiek wspierają istnienie autoregulacji w obrębie sieci neuronalnej GnRH.

Aktywacja receptorów GABA_A u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego przy użyciu muscimolu spowodowała obniżenie ekspresji genu *GnRH* w badanych strukturach OUN (tj. POA, AH i VMH), natomiast ich zablokowanie bikukulina wykazało działanie przeciwstawne. W efekcie stymulacji tych receptorów, poziom LH we krwi obwodowej ulegał obniżeniu ze zmniejszeniem częstotliwości pulsów, natomiast skutek blokowania – podwyższeniu bez zmian zarówno częstotliwości, jak i amplitudy pulsów. Uzyskane przez Doktorantkę wyniki wskazują, że GABA działając za pośrednictwem receptorów GABA_A wywiera hamujący wpływ na procesy molekularne prowadzące do biosyntezy GnRH i w konsekwencji powoduje zmniejszenie aktywności sekcyjnej układu GnRH/LH. Autorka rozprawy rozważa możliwość bezpośredniego działania GABA na neurony GnRH u owiec, mimo że dotychczas nie potwierdzono obecności na nich receptorów GABA_A. Obecność tych receptorów wykazano na neuronach GnRH u myszy, zaś u owiec opisano lokalizację aksonów neuronów GABA-ergiczných w bliskim sąsiedztwie neuronów GnRH. Powołując się na fakt, że receptory GABA występują w wielu układach neuronalnych podwzgórza (m.in. noradrenaliny, dopaminy i β-endorfiny), Autorka wskazuje możliwość działania GABA na neurony GnRH w sposób pośredni poprzez inne systemy neuronalne.

Badania Doktorantki potwierdzają, że układ GABA i jego receptora GABA_A także uczestniczy w regulacji ekspresji genu *GnRHR* i jego działanie w tym przypadku ma efekt

podobny do obserwowanego w odniesieniu genu *GnRH*, tj. hamowanie – po zastosowaniu agonisty i stymulacja – po podaniu antagonisty. W *Dyskusji*, Doktorantka m.in. stwierdza, że o ile wyjaśnienie zmian poziomu mRNA *GnRHR* w przysadce po podaniu GnRH jest łatwe (bowiem mogą one bezpośrednio przekładać się na jej reaktywność na GnRH), o tyle zmiany w poziomie transkryptu *GnRHR* w strukturach podwzgórza są trudne do interpretacji, gdyż rola podwzgórzowych receptorów gonadoliberyny w regulacji aktywności sekrecyjnej układu GnRH/gonadotropiny nie została jeszcze ustalona. W zakończeniu rozprawy doktorskiej, Doktorantka przedstawia 5 ogólnie sformułowanych wniosków (uwagę dotyczącą wniosków zamieszczam w następnej części recenzji).

Reasumując, badania przeprowadzone przez mgr Magdalenę Łapot w ramach pracy doktorskiej wykazały wpływ blokowania receptorów dopaminy D2 i podawania egzogenego GnRH u owiec anestralnych oraz aktywacji i blokowania receptorów GABA_A u owiec anestralnych na ekspresję genu *GnRH* w wybranych obszarach podwzgórza (POA, AH VMH i SME) i jego receptora (*GnRHR*) w tych samych obszarach i przednim płacie przysadki, jak również na poziom LH we krwi obwodowej. Mimo, że badania zostały przeprowadzone w latach 2005-2007, ich wyniki zachowały swoją aktualność do tej pory. Doktorantka przedstawiła je w formie rozprawy, uwzględniając w opracowaniu piśmiennictwo, które pojawiło się po ukazaniu się trzech prac oryginalnych w latach 2008-2009, dotychczas cytowanych przez innych autorów 29 razy. W ocenianej rozprawie, Doktorantka powołała się na 60 dodatkowych pozycji piśmiennictwa, które ukazały się po roku 2009.

UWAGI i PYTANIA

Podczas czytania ocenianej rozprawy doktorskiej nasunęło mi się kilka uwag i pytań, które przedstawiam poniżej.

1. W maszynopisie rozprawy, w odniesieniu do podawanych roztworów badanych substancji w płynie Ringera, prawdopodobnie pomyłkowo używano określenia „dawka” zamiast „stężenie”. Na szczęście, takiego błędu nie popełniono w pracach oryginalnych.
2. W odniesieniu do *Doświadczenia II*, nasuwa się pytanie o bliższe informacje na temat preparatu GnRH podawanego zwierzętom doświadczalnym; czy był to naturalny decapeptyd, czy analog GnRH? Jeśli był to analog, czy wiadomo jaki jest jego okres półtrwania w organizmie?
3. Jakie były przesłanki przyjętych dawek badanych substancji i zastosowanego czasowego schematu ich infuzji do III komory mózgu.
4. W badaniach Autorki, w przeciwieństwie do wcześniejszych doniesień, nie stwierdzono obecności mRNA *GnRH* w SME. Nasuwa się więc pytanie: jakie mogą być przyczyny tej różnicy? Bardzo proszę Doktorantkę o przeanalizowanie tej sytuacji.
5. Czy – zdaniem Doktorantki – zróżnicowana efektywność dyfuzji/penetracji badanych substancji z III komory mózgu do struktur, w których określano ekspresję genów *GnRH* i *GnRHR* mogła w jakimś stopniu mieć wpływ na uzyskane wyniki?
6. Odnosząc się do wniosków, sugeruję Autorce podjęcie próby ich przereformulowania aby uniknąć niejasności (we wniosku 2) lub zbyt dużego wykraczania poza zakres przeprowadzonych badań (we wniosku 4).
7. Z obowiązku recenzenta poniżej wskazuję także drobne błędy redakcyjne zauważone w pracy, które w żaden sposób nie obniżają jej poziomu merytorycznego.
 - W podpisie Rys. 3.1. niezręcznie brzmi powołanie się w formie skrótu myślowego na pracę Ciechanowskiej i wsp. z roku 2016.
 - W jednym miejscu (*str.* 36/*cel* 3) pojawiła się obecnie nieużywana nazwa „przysadka mózgowa”.

- W wyrażeniu „mRNA kodującego *GnRH* i *GnRHR*” nie jest potrzebne stosowanie kursywy, ponieważ w tym przypadku chodzi o nazwy decapeptydu i jego receptora (na str. 42 i w wielu innych miejscach).
- Skrót minuty „min” powinien być pisany bez kropki (str. 44/4 wiersz od dołu i w innych miejscach).
- Błąd literowy, powinno być „z użyciem” (str. 47/2 wiersz od dołu).
- Myśl zawarta w zdaniu „Dla tej przyczyny transkrypcja i translacja mogą być zarówno dalekie -, jak i bliskie prostej i liniowej zależności.” mogłaby być przystępniej sformułowana (str. 67/13-14 wiersz).

PODSUMOWANIE

Rozprawa doktorska mgr Magdaleny Łapot zawiera wartościowe dane, które opisują wpływ podawania antagonisty receptorów dopaminy D2 i egzogenego GnRH u owiec anestralnych oraz agonisty i antagonisty receptorów GABA_A u owiec w fazie pęcherzykowej cyklu estralnego na ekspresję genu *GnRH* w wybranych obszarach podwzgórza (POA, AH VMH i SME) i genu *GnRHR* w tych samych obszarach podwzgórza i przednim płacie przysadki z uwzględnieniem zmian w poziomie LH we krwi obwodowej. Przedstawione w rozprawie badania przedstawiają naturalne reakcje zwierząt doświadczalnych na testowane substancje, które podawano w formie infuzji do III komory mózgu. Procedury wykonywania takich doświadczeń charakteryzuje wysoki stopień trudności i są one przeprowadzane w nielicznych ośrodkach badawczych. Na wysoką wartość przedstawionych w rozprawie doktorskiej wyników składa się wykorzystanie w badaniach właśnie takiej procedury oraz określenie w tych badaniach wpływu badanych czynników na ekspresję genów (*GnRH* i *GnRHR*), pełniących kluczową rolę w regulacji procesów rozrodczych. Wprawdzie badania przedstawione w rozprawie doktorskiej mgr Magdaleny Łapot były jakiś czas temu wykonane, ale ich wyniki ciągle są aktualne. Przeprowadzenie tych badań wymagało od Doktorantki dużego zaangażowania w zdobywanie nowej wiedzy i nabywanie umiejętności.

WNIOSEK KOŃCOWY

W zakończeniu pragnę stwierdzić, że przedstawiona do oceny rozprawa zatytułowana **”Wybrane mechanizmy neuronalnej regulacji ekspresji genu *GnRH* i genu receptora *GnRH* w układzie podwzgorzowo-przysadkowym owcy”** spełnia wszystkie wymagania – określone w Ustawie nr 595 o Stopniach Naukowych i Tytule Naukowym oraz Stopniach i Tytule w Zakresie Sztuki z dnia 14.03.2003 r. (która obowiązywała w okresie realizacji badań i wszczęcia przewodu doktorskiego w 2008 r.) – stawiane rozprawom doktorskim i w związku z powyższym zwracam się do Wysokiej Rady Naukowej Instytutu Fizjologii i Żywienia Zwierząt im. Jana Kielanowskiego Polskiej Akademii Nauk w Jabłonie z wnioskiem o dopuszczenie mgr Magdaleny Łapot do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Olsztyn 26.07.2022 r.

Stanisław Okrasa

S Okrasa