

dr hab. Iwona Bogacka, prof. UWM
Katedra Fizjologii Zwierząt
Wydział Biologii i Biotechnologii
UWM w Olsztynie
10-718 Olsztyn
Ul. Oczapowskiego 1A

Olsztyn, 16 maja 2017 r.

Ocena rozprawy doktorskiej mgr. Mirosława Kucharskiego
pt. Zmienność genetyczna w *loci* wybranych genów warunkujących przemianę
kwasów tłuszczowych u owcy domowej (*OVIS ARIES*)

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska prezentuje wyniki badań dotyczących identyfikacji zmienności genetycznej w różnych rejonach sekwencji czterech genów zaangażowanych w przemianę kwasów tłuszczowych (*FABP4* – 4. białko wiążące kwasy tłuszczowe, *PPAR α* i *PPAR γ* – dwie izoformy receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów; *SCD* – desaturaza sterylo-CoA) u ras owiec o zróżnicowanym typie użytkowym (mięсны – Suffolk i ile de France; mleczno-plenny – owca kołodzka i owca olkuska; prymitywny – polska owca górská). Ponadto, duża część pracy poświęcona jest badaniu wpływu czynników takich jak wiek, zróżnicowane żywienie i rasa na ekspresję wymienionych wyżej genów oraz profil kwasów tłuszczowych w wybranych tkankach.

Poznanie kompletnej struktury genomu *Ovis aries* i opublikowanie jej w 2014 roku umożliwiło wielu grupom badawczym wykorzystanie nowych strategii w badaniach genetycznych u tego gatunku. Pozwalają one na analizowanie zmienności genetycznej pojedynczych genów, które mogą stanowić podstawę do porównania różnych ras w kontekście ich pochodzenia czy typu użytkowego. To właśnie cechy użytkowe decydują o właściwej selekcji zwierząt. Z tych powodów, w ciągu ostatnich kilku lat nastąpiła intensyfikacja badań nad strukturą genów związanych z metabolizmem lipidów w tkance tłuszczowej u owcy. Ponieważ wiedza na temat genetycznych uwarunkowań, które mogłyby decydować o użytkowych typach owiec wciąż pozostaje niepełna, dlatego bardzo pozytywnie oceniam wybór tematyki badań przez Doktoranta. Uważam, że te badania są nie tylko interesujące i aktualne z punktu widzenia biologa, ale także potrzebne z punktu widzenia hodowcy.

Formalny opis rozprawy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska jest opracowaniem w języku polskim, które obejmuje 188 stron maszynopisu, w tym 47 rycin, 16 tabel, 6 zdjęć i aż 414 pozycji piśmiennictwa, w przeważającej części anglojęzycznego (zacytowano tylko 5 publikacji

w języku polskim). Praca posiada wszystkie istotne wymagane i typowe dla rozprawy doktorskiej rozdziały tj. spis treści, wykaz stosowanych skrótów, wprowadzenie, przegląd literatury, hipotezy badawcze i cele pracy, materiał i metody, wyniki oraz ich omówienie w dyskusji, podsumowanie, stwierdzenia i wnioski oraz piśmiennictwo. W końcowej części pracy (przed piśmiennictwem) umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Moim zdaniem, ta część powinna znaleźć się raczej na początku rozprawy, ponieważ to właśnie streszczenie wprowadza czytelnika w obszar omawianego problemu. W analizowanej rozprawie, taką funkcję wydaje się pełnić dwustronicowe *wprowadzenie*, w którym Doktorant przedstawia w skrócie m.in. zakres eksperymentów wykonanych w ramach rozprawy oraz uzasadnia wybór genów do analiz. Uzasadnienie wyboru problemu naukowego i genów do analizy powinno z kolei być płynnym przejściem do formułowania hipotez i celów badawczych. Uważam też, że tytuł rozprawy jest znacznie zawężony, ponieważ uwzględnia jedynie badanie zmienności genetycznej w *loci* czterech genów warunkujących przemianę kwasów tłuszczowych, co stanowi część pierwszą rozprawy, a zupełnie pomija określenie wpływu czynników (rasy, żywienia i wieku) na ekspresję tych genów oraz profil kwasów tłuszczowych w wybranych tkankach, co jest przedmiotem drugiej części rozprawy.

Ocena merytoryczna rozprawy

W 30-stronicowym *Przeglądzie literatury*, który stanowi wstęp rozprawy, Doktorant w siedmiu podrozdziałach przejrzysto przedstawia aktualny stan wiedzy na temat zagadnień będących przedmiotem Jego badań. Na początku, w skrócie omawia tkankę tłuszczową; prezentuje jej rodzaje, opisuje krótko podstawowe procesy w niej zachodzące oraz analizuje funkcje wydzielnicze/endokrynne tej tkanki. Podkreśla również znaczenie energetycznej homeostazy organizmu w kontekście rozwoju nadwagi i otyłości. W kolejnych podrozdziałach Doktorant krótko prezentuje budowę, właściwości i funkcje kwasów tłuszczowych oraz w sposób obszerny i wyczerpujący charakteryzuje cztery wybrane czynniki – białko wiążące kwasy tłuszczowe (FABP), dwie izoformy receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów (PPAR α i PPAR γ) oraz desaturazę sterylo-CoA (SCD). Opisuje białko, gen oraz pełnione funkcje (zaczęłabym od charakterystyki genu, poprzez białko jako produktu jego ekspresji i na końcu – pełnione funkcje). Pozytywnie oceniam też podrozdział, w którym Doktorant przekonuje czytelnika o wyborze owcy jako dobrego modelu do badań biologicznych. Uważam, że podrozdział ten, umieszczony w końcowej części rozdziału, a nie w jego środku, stanowiłby dobre połączenie z kolejnym rozdziałem prezentującym hipotezy i cele badawcze.

Niemniej jednak tę część pracy uważam za wartościową, a ogromna ilość cytowanej literatury świadczy o bardzo dobrej znajomości tematu w obszarze podjętych zadań badawczych. Doktorant nie ustrzegł się jednak pewnych niedociągnięć, które mają charakter raczej redakcyjny, ale powinnam o nich wspomnieć z obowiązku recenzenta. Szkoda, że Autor nie uwzględnił żadnych rycin/schematów, które z pewnością ułatwiłyby i uatrakcyjniły analizowanie tej części rozprawy. Sugerowałabym też wyodrębnianie większej ilości akapitów. W wielu przypadkach brak podziału tekstu na odpowiednie akapity znacznie obniża czytelność i przejrzystość pracy. Czasami jeden akapit obejmuje ponad jedną stronę tekstu i dotyczy różnych wątków (np. podrozdział „dodatni bilans energetyczny”, „rodzaje tkanki tłuszczowej” oraz kilka innych fragmentów rozprawy). Proponowałabym zastosowanie polskiego określenia „inaktywowany gen” zamiast niepoprawnych: „knockdown” lub „knockown” (str. 21). Jeśli jednak istnieje potrzeba użycia angielskiej formy „knockout”, to sugeruję zastosowanie spolszczonego, dosyć często stosowanego określenia „nokautowany”. Chciałabym także zwrócić uwagę na kilka potknięć językowych: powinno być „adipokiny lub adipocytokiny” zamiast „adiponektyny” (str. 11 i 14); „triglycerides” zamiast „triglicerydes” (str. 7, 11); „jonów wapnia” zamiast „jonów wapna” (str. 23); niejednolite stosowanie nazwy enzymu desaturaza (str. 32, 33, 34) lub desaturasa (str. 6, 32). Błąd wkradł się również przy opisie kwasów tłuszczowych; grupa -OH nie jest grupą metylową (str. 15). Na str. 12 (pierwsza linia) zamiast „WAT” powinno być „BAT”. W tekście znalazłam też kilka niefortunnych określeń: „transkryptomu genów” (str. 9), „ekspresja jest zróżnicowana płcią” (str. 33), „świński gen” (str. 26).

W kolejnym rozdziale Doktorant prezentuje *Hipotezy badawcze i cele pracy*. W mojej opinii, sformułowano je poprawnie i przedstawiono w jasny i przejrzysty sposób. Uważam też, że wszystkie cele, postawione przez Doktoranta, zostały w pełni zrealizowane.

Materiał i metody zostały przedstawione w 27-stronicowym rozdziale. Został on podzielony na dwa podrozdziały; każdy jest uporządkowany i zawiera opis zwierząt doświadczalnych, część metodyczną oraz sposób analizowania wyników. Pierwszy podrozdział opisuje *Doświadczenie I*, które dotyczy analizy zmienności genetycznej w rejonie sekwencji regulatorowych, miejsc splicingowych i sekwencji kodujących cztery wybrane geny (FABP4, PPAR α , PPAR γ , SCD) u pięciu ras owiec charakteryzujących się różnym typem użytkowym (owca kołudzka, owca olkuska, polska owca górska, ile de France, Suffolk). Natomiast drugi podrozdział prezentuje *Doświadczenie II*, w którym określono wpływ trzech czynników – wieku, żywienia i rasy – na ekspresję genów (analizowanych także w doświadczeniu I) oraz

profil kwasów tłuszczowych w wybranych tkankach – wątrobie, mięśni najdłuższym grzbietu oraz dwugłowym.

Rozdział został przygotowany w sposób właściwy, a zakres stosowanych metod jest szeroki, co wskazuje na duże umiejętności Doktoranta i bogaty warsztat eksperymentalny w zakresie biologii molekularnej. Chciałabym również podkreślić, że metody, zastosowane w pracy są nowoczesne i dobrze dobrane do założonych celów badawczych. Analizy statystyczne zostały szczegółowo opisane i odpowiednio zastosowane. Ta część rozprawy zyskałaby jednak na przejrzystości, gdyby uwzględniono w niej: 1) tabelę z podstawową charakterystyką zwierząt obejmującą rasę, typ użytkowy/konstytucyjny, masę ciała (Doświadczenie I) oraz 2) przemyślany schemat doświadczalny, uwzględniający grupy zwierząt (również rasy) oraz analizowane parametry (Doświadczenie II). W doświadczeniu II, wpływ wieku na ekspresję genów w tkankach oraz profil kwasów tłuszczowych analizowany był u maciorek polskiej owcy górskiej, natomiast wpływ zróżnicowanej diety oraz rasy – u tryków ras ile de France i kołudzkiej. W związku z tym, bardzo prosiłabym o krótki komentarz uzasadniający wybór różnych ras i płci w tym doświadczeniu, zwłaszcza przy analizie wpływu wieku i żywienia. W opisie doświadczenia II zabrakło informacji na temat liczby osobników w grupie 2 (str. 56). Na tej samej stronie 56, niejasne jest sformułowanie „po osiągnięciu założonego wieku zwierzęta ubito...” (str. 56); na podstawie tekstu wynika, że do grup I i II zakwalifikowano odpowiednio młode maciorki w wieku 3. miesięcy i 3. lat, żywiono je następnie zielonką pastwiskową i sianem. Nasuwa się pytanie przez jaki okres zwierzęta żywiono i w jakim wieku były tuż przed ubojem? Mało precyzyjne jest także określenie „osobniki dojrzałe fizjologicznie”, czyli jakie? (str. 56). Kolejna uwaga dotyczy opisu poszczególnych metod. Większość z nich została przedstawiona w sposób precyzyjny i wyczerpujący (np. analiza HRM, sekwencjonowanie, izolacja RNA, reakcja odwrotnej transkrypcji, real time PCR), ale analizę profilu kwasów tłuszczowych opisano bardzo oszczędnie. Interesuje mnie także, czy w badaniu względnego poziomu ekspresji genu za pomocą real time PCR zastosowano jeden czy dwa geny referencyjne – *GAPDH* i *RPS27*? W części dotyczącej opisu analizy statystycznej zabrakło informacji nt. poziomu istotności *p* przy określaniu różnic statystycznie istotnych. Przy cytowaniu programu Statistica proponowałabym stosować jego źródłową wersję „StatSoft Inc, Tulsa USA”.

Wyniki pracy zaprezentowano na 58. stronach maszynopisu. Rozdział ten składa się z dwóch części, w których Doktorant zastosował tę samą kolejność zadań badawczych opisanych w celach oraz materiałach i metodach. Ta część rozprawy obejmuje 47 rycin (35 w części I oraz 12 – w części II), 16 tabel (6 w części I i 10 – w części II) oraz 6 zdjęć

(elektroforegramów w części I). W części I, Doktorant prezentuje w jasny i logiczny sposób wyniki doświadczenia polegającego na identyfikacji polimorfizmów w sekwencji genów FABP4, PPAR α , PPAR γ i SCD oraz wskazaniu możliwych zależności pomiędzy zmiennością genetyczną a typem użytkowym owiec. Dokumentacja graficzna wyników w postaci rycin, zdjęć i tabel jest czytelna i raczej nie budzi zastrzeżeń. W ramach swojej rozprawy doktorskiej Pan mgr Kucharski zidentyfikował sześć polimorfizmów: po dwa w genach FABP4, PPAR γ oraz SCD. Należy podkreślić, że jeden z tych polimorfizmów, substytucja *945G>A w rejonie regulatorowym 3'-UTR genu SCD, został opisany po raz pierwszy i zgłoszony w bazie GenBank (nie BankGene, str. 152). Z kolei, drugi ze zidentyfikowanych polimorfizmów w genie SCD – *1116A>G – jest związany z typem użytkowym determinującym otłuszczenie i umięśnienie u owcy. Niestety, nie udało się scharakteryzować żadnego polimorfizmu w genie PPAR α , pomimo wytypowania aż ośmiu potencjalnych miejsc polimorficznych. Mam kilka uwag do tego podrozdziału: 1) w chromatogramie na Ryc. 5.8. wystąpiły błędy w opisie genotypów; zamiast genotypu AA (a) powinien być genotyp GG, a zamiast TT (b) – AA; 2) w opisie Ryc. 5.32.: tranzycja dotyczyła chyba zamiany guaniny w adeninę a nie odwrotnie jak wskazują dwie pierwsze linijki tekstu na str. 97; 3) słaba jest rozdzielczość (jakość) niektórych elektroforegramów; dotyczy to zwłaszcza rozdziału produktów prezentowanego na zdjęciach 5.1 i 5.5. Wskazanie wielkości fragmentów markera masy molekularnej na prezentowanych rozdzielaczach elektroforetycznych znacznie ułatwiłoby analizę wielkości uzyskanych produktów, 4) zastanawiam się dlaczego przy prezentacji chromatogramu na Ryc. 5.35. zaprezentowano wszystkie trzy genotypy, a w innych przypadkach ograniczono się jedynie do homozygot. 5) Czym się różni mutacja c.*1116A>G (opis Ryc. 5.35) od mutacji c.945G>A (opis Ryc. 5.33); chodzi mi tu o tę gwiazdkę; 5) proponowałabym stosowanie określenia „u owcy rasy Suffolk” zamiast skrótu myślowego „u suffolków”.

Druga część rozdziału Wyniki poświęcona jest analizie wpływu wybranych czynników – wieku, żywienia i rasy – na profil kwasów tłuszczowych w dwóch rodzajach tkanki mięśniowej: tkance mięśnia najdłuższego grzbietu (*longissimus lumborum*) i mięśnia dwugłowego uda (*biceps femoris*) oraz ekspresję genów FABP4, PPAR α , PPAR γ i SCD w wątrobie oraz w tkance mięśniowej. Ta część pracy, ilustrowana rycinami i tabelami, jest logicznie podzielona na odpowiednie podrozdziały charakteryzujące wpływ każdego z badanych czynników. W swojej pracy Doktorant stwierdził, że wiek może być czynnikiem regulującym ekspresję wybranych genów w analizowanych tkankach pobranych od polskiej owcy górskiej. Zaobserwowano zależne od wieku zmiany w ekspresji genów FABP4 i SCD w wątrobie oraz PPAR α , PPAR γ i SCD w tkance mięśnia dwugłowego uda. Nie zanotowano

natomiast różnic w ekspresji analizowanych transkryptów w tkance mięśnia najdłuższego grzbietu. Podobnie, nie stwierdzono zmian w profilu kwasów tłuszczowych w tłuszczu śródmięśniowym w obu badanych tkankach mięśniowych. W swojej pracy doktorskiej, mgr Kucharski wykazuje wpływ zróżnicowanej diety na profil kwasów tłuszczowych w tłuszczu śródmięśniowym tkanki mięśnia najdłuższego grzbietu (w tabeli 5.10. należałoby uwzględnić rasę owiec). Stwierdza również zmiany w ekspresji wybranych genów; dotyczą one FABP4 w tkance mięśnia najdłuższego grzbietu (w grupie *ad libitum*), PPAR γ w tkance wątroby i mięśnia najdłuższego grzbietu (w grupie *ad libitum*), SCD w tkance mięśnia najdłuższego grzbietu (w grupie *ad libitum*) owiec (tu znowu nie jestem pewna jak to rasa owiec, ponieważ wyniki opisujące wpływ rasy na ekspresję wybranych genów w następnej części rozprawy uwzględnia też reżim żywieniowy i ekspresję genów w tkankach, tam z kolei obserwuje się brak różnic w ekspresji wybranych genów, należy uporządkować te informacje). Bardzo interesująca wydaje się zależność u owiec żywionych *ad libitum*, u których zwiększenie spożycia tłuszczów i wprowadzenie do mieszanek pasz bogatych w PUFA (C18:3 n-3) prowadzi do wzrostu ekspresji genów FABP4, PPAR γ i SCD a także zwiększenia zawartości PUFA n-3 i n-6 w tkance mięśnia najdłuższego grzbietu. Z kolei w żywieniu dawkowanym owiec, zwiększenie spożycia tłuszczów i wprowadzenie do diety pasz bogatych w PUFA nie wywołuje zmian w ekspresji analizowanych genów, ale obniża zawartość jednonienasyconych kwasów tłuszczowych w tkance mięśnia najdłuższego grzbietu. W pracy wykazano również, że ostatni z badanych czynników – rasa owiec – nie wpływa na profil kwasów tłuszczowych w tkance mięśniowej oraz na ekspresję mRNA analizowanych genów.

Po analizie tej części rozprawy stwierdzam, że zakres przeprowadzonych badań jest szeroki, a uzyskane wyniki są interesujące, mam jednak pewne zastrzeżenia do opisu niektórych z nich. Nie są one czasami wystarczająco precyzyjnie przedstawione, np. analizując wpływ wieku na profil kwasów tłuszczowych stwierdzono statystycznie istotne różnice w zawartości kwasów tłuszczowych: palmitynowego i oleopalmitynowego (str. 105), ale w tekście nie podano w jakiej tkance (można to wywnioskować z tabeli). Przy opisie wyników należałoby także zaznaczyć na czym polegają te „istotne zmiany” (gdzie w porównaniu z czym nastąpił wzrost czy spadek badanego parametru). Z kolei inny przykład mało precyzyjnego opisu uzyskanych wyników dotyczy obserwacji Autora, że u 3-letnich osobników zanotowano wyższy poziom ekspresji genu FABP4 zarówno w tkance mięśniowej jak i wątrobie (str. 107 i Ryc. 5.36). Jednak według mnie, ten wzrost dotyczy jedynie wątroby, ponieważ w analizowanych dwóch rodzajach tkanki mięśniowej obu grup doświadczalnych ekspresja genu FABP4 pozostawała na podobnym poziomie (nie zanotowano różnic statystycznie

istotnych, przynajmniej nie zaznaczono ich na rycinie). W nauce nie można określać nieistotnych statystycznie wzrostów lub spadków jakichkolwiek parametrów (pomimo podania wartości $p > 0,05$) – w takim przypadku należy uznać brak wpływu lub brak różnic. Ta moja uwaga dotyczy wielu fragmentów analizowanej części pracy (właściwie większości rycin) i mam nadzieję, że Autor weźmie ją pod uwagę podczas przygotowania publikacji do druku. Kolejne pytanie nasuwa się po analizie wpływu lokalizacji tkanki mięśniowej na poziom ekspresji genów (np. str. 108 i ekspresja genu PPAR γ); w jaki sposób analizowano te różnice, czy zastosowano analizę dwuczynnikową (jeden czynnik to wiek a drugi to rodzaj tkanki); jeśli takie różnice zanotowano to powinny one znaleźć odzwierciedlenie również na rycinach. Podobnie, wszelkiego rodzaju różnice statystycznie istotne, opisywane w tekście, powinny znaleźć odzwierciedlenie w tabelach. Przykładem niech będzie tabela 5.11, w której nie wskazano żadnych różnic statystycznych, jednak w tekście (str. 122) Autor opisuje, że zmiany występują w zakresie zawartości tłuszczu śródmięśniowego i tłuszczu nad żebrami.

Dyskusja obejmuje 24 strony maszynopisu i zawiera omówienie uzyskanych wyników w świetle aktualnej literatury. Ta część rozprawy podzielona jest, konsekwentnie jak poprzednie rozdziały, na dwie części odzwierciedlające podjęte przez Doktoranta cele badawcze. W moim odczuciu *Dyskusja* jest wszechstronna i wyczerpująca. Po rozdziale z dyskusją znajdują się dwa kolejne rozdziały; jeden to podsumowanie a drugi to stwierdzenia i wnioski. Nie bardzo rozumiem czym są stwierdzenia w tym przypadku i czym różnią się od podsumowania. Oba rozdziały zawierają podobne treści, chociaż może trochę inaczej wyrażone. Uważam, że oba rozdziały można było połączyć i zaprezentować rozdział „podsumowanie i wnioski”. Moje wątpliwości budzi stwierdzenie 3 (str. 155); a może to zmienność genetyczna w locus c*1116A>G genu SCD warunkuje typ użytkowy determinujący otłuszczenie i umięśnienie owcy domowej a nie odwrotnie?

Podsumowując ocenę rozprawy doktorskiej pragnę stwierdzić, że uzyskane przez Doktoranta wyniki stanowią cenne uzupełnienie wiedzy z zakresu genetyki i nutrigenomiki, dostarczając nowych informacji na temat: 1) zmienności genetycznej (polimorfizmów pojedynczego nukleotydu, SNP) w sekwencji genów FABP4, PPAR α , PPAR γ i SCD u owiec o różnym typie użytkowym, 2) wpływu czynników tj. wieku, zróżnicowanego żywienia i rasy na ekspresję wymienionych genów oraz na profil kwasów tłuszczowych w wybranych tkankach owcy domowej. Należy podkreślić, że jeden z sześciu scharakteryzowanych polimorfizmów – w rejonie regulatorowym 3'-UTR genu SCD – opisano w pracy po raz pierwszy. Zatem oceniana rozprawa nie tylko dostarcza nowych danych, które wzbogacają istniejącą wiedzę,

ale istotny wydaje się też fakt, że informacje te stanowią podstawę do prowadzenia kolejnych eksperymentów nt. możliwej relacji pomiędzy wykrytym polimorfizmem a parametrami użytkowymi owiec (tempem wzrostu, wartością rzeźną czy jakością mięsa). Doktorant wykazał, że posiada dużą wiedzę w podjętym obszarze naukowym oraz umiejętności w doborze i posługiwaniu się licznymi a jednocześnie nowoczesnymi metodami biologii molekularnej. Na podkreślenie zasługuje również szeroki zakres prowadzonych badań naukowych oraz kompleksowe podejście do rozpatrywanego problemu. Na podstawie analizy ocenianej rozprawy doktorskiej można także sądzić, że Doktorant posiada ważne dla naukowca cechy takie jak pracowitość, dociekliwość, wytrwałość. Uważam, że tak duża liczba przeprowadzonych eksperymentów z uwzględnieniem różnych układów doświadczalnych, skutkująca uzyskaniem pokaźnej ilości wyników przełoży się na powstanie kilku wartościowych publikacji w dobrych czasopismach. Chciałabym jednocześnie zaznaczyć, że przedstawione w mojej ocenie uwagi nie umniejszają dużej wartości naukowej pracy, ani też znaczenia przeprowadzonych eksperymentów, a jedynie ułatwią przygotowanie publikacji do druku.

Wniosek końcowy

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska pt. „Zmienność genetyczna w loci wybranych genów warunkujących przemianę kwasów tłuszczowych u owcy domowej (OVIS ARIES)” w pełni spełnia wymogi określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule naukowym w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, z późniejszymi zmianami) i zwracam się do Rady Wydziału Matematyczno-Przyrodniczego, Uniwersytetu Jana Kochanowskiego w Kielcach, o przyjęcie rozprawy doktorskiej Pana mgr. Mirosława Kucharskiego oraz dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Z poważaniem

