

Lublin, 15 marca 2019 r.

Prof. dr hab. Wiesław I. Gruszecki
Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej
w Lublinie

Ocena rozprawy doktorskiej mgr Eweliny Baran pt. „Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)”

Unikalne właściwości fizyko-chemiczne wody, wynikające w znacznym stopniu z możliwości tworzenia znacznej liczby wiązań wodorowych, jak na tak małą cząsteczkę (dwukrotnie jako donor i dwukrotnie jako akceptor wiązania), przekładają się na szczególną rolę tego składnika żywych organizmów w procesach życiowych oraz w stabilizacji strukturalnej w komórkach. Nieodmiennie, budzą moją fascynację oraz pokorę poznawczą obserwacje „ożywiania” poprzez uwodnienie suchego proszku, zamkniętych przez producentów w torebkach liofilizowanych kultur drożdży. W ten właśnie nurt poznawania tajemnic Natury wpisuje się centralnie rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Ewelinę Baran, dotycząca bezpośrednio zagadnień związanych z rehydratacją anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, pozbawionej wody do skrajnie niskiego poziomu (poniżej 3 % wagowych). Tematykę rozprawy postrzegam więc z pewnością jako wysoce interesującą ale również ważną z naukowego punktu widzenia, w aspekcie poznania mechanizmów na poziomie molekularnym, umożliwiających aktywność procesów życiowych w warunkach stresowych, w szczególności w warunkach skrajnego odwodnienia.

Zakład Biofizyki, Instytut Fizyki
Wydział Matematyki, Fizyki i Informatyki
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej

pl. Marii Curie-Skłodowskiej 1
20-031 Lublin
tel. (81) 537 62 50
fax (81) 537 61 91
e-mail: info@biofizyka.umcs.lublin.pl



Praca doktorska wykonana została pod zjednoczonym kierownictwem profesorów Huberta Harańczyka z Zakładu Fizyki Medycznej, Instytutu Fizyki oraz Stanisława Knutelskiego z Zakładu Entomologii, Instytutu Zoologii i Badań Biomedycznych Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie. Rozprawa zredagowana została w języku polskim, na 176 stronach standardowego maszynopisu, według typowego, optymalnego w moim odczuciu układu. Właściwą treść rozprawy poprzedza półtorastronicowe wprowadzenie zatytułowane „Wprowadzenie i zawartość pracy”. W ramach rozdziału pierwszego, zatytułowanego „Wstęp”, Autorka prezentuje przegląd aktualnej wiedzy dotyczącej problemów związanych z badanym organizmem modelowym, akcentując, między innymi, problemy związane z systematyką, cyklem życia oraz budową morfologiczną ochotki afrykańskiej. Specjalne sekcje rozdziału wstępnego poświęcone zostały analizie czynników na poziomie molekularnym, charakteryzujących adaptację organizmów do stanu anhydrobiozy, w tym akumulację cukru trehalozy. Ważną część „Wstępu” stanowi również dyskusja problemów związanych z rolą wody w organizmach żywych. Obszerną część wstępną rozprawy, Doktorantka wykorzystała również jako miejsce prezentacji podstawowej wiedzy dotyczącej stosowanych podejść metodologicznych, włączając analizy izoterm sorpcyjnych oraz techniki magnetycznego rezonansu jądrowego (MRJ). Ten ostatni fragment, dotyczący podstaw fizycznych procesu magnetycznego rezonansu jądrowego, ze względu na swój zakres oraz klarowność, polecany być może jako źródło cennych informacji studentom oraz młodym adeptom nauki. Szczegóły eksperymentalne badań prowadzonych w ramach projektu doktorskiego, z zastosowaniem tych technik badawczych, zaprezentowane zostały w ramach rozdziału 2. pt. „Materiały i metody”. W mojej ocenie, poziom szczegółowości zawartych w tej części rozprawy opisów w pełni odpowiada standardom, zgodnie z którymi odtworzyć można wykonywane eksperymenty. W tym miejscu swojej analizy chciałbym zwrócić szczególną uwagę na zastosowanie całego wachlarza technik analitycznych, w tym techniki grawimetryczne, analizy strukturalne opierające się o mikroskopię elektronową i mikro-tomografię rentgenowską oraz, przede wszystkim, zaawansowane podejścia z obszaru spektroskopii MRJ. Zastosowanie tak wielu podejść metodologicznych, w ramach realizacji pracy doktorskiej, umożliwiło, na drodze synergii, uzyskanie wielu cennych wyników naukowych. Opisy przeprowadzonych eksperymentów



oraz prezentacja uzyskanych w ramach pracy doktorskiej wyników, zawarte zostały w ramach rozdziału 3. rozprawy pt. „Wyniki”. Podstruktura tego rozdziału odpowiada sekwencji poszczególnych zadań badawczych realizowanych w ramach projektu doktorskiego.

Były to, między innymi:

1. Analizy SEM larw na różnych etapach uwodnienia,
2. Mikro-tomografia rentgenowska larw,
3. Morfometria w oparciu o analizy mikroskopowe larw,
4. Pomiary kinetyki hydratacji larw na drodze rejestracji izoterm sorpcyjnych,
5. Pomiary magnetycznej relaksacji $^1\text{H-NMR}$ na różnych etapach uwodnienia larw,
6. Analizy widm $^1\text{H-NMR}$ na różnych etapach uwodnienia larw.

Uzyskane wyniki poddane zostały wieloaspektowej dyskusji w ramach rozdziału 4. pt. „Dyskusja wyników”. W pełni podzielam zdanie Doktorantki w zakresie wskazania najważniejszych osiągnięć pracy, wyartykułowanych w ramach rozdziału 5. pt. „Wnioski”. Osobiście, za najbardziej interesujące i nośne uważam:

1. Wynik obserwacji, zgodnie z którym rehydratacja larwy ochotki afrykańskiej przebiega w zasadzie w oparciu o kinetykę liniową, co wskazuje na aktywność procesów fizycznych, bez udziału procesów regulacji na poziomie fizjologicznym.
2. Brak procesów zamarzania i formowania objętościowej fazy lodu w ochładzanej dehydratowanej larwie, przy jednoczesnej niekooperatywnej immobilizacji cząsteczek wody. Mechanizm taki wskazuje na strategię organizmu polegającą na unikaniu degradacji struktur komórkowych przez mikrokryształki lodu.

Na podkreślenie zasługuje wyjątkowo wysoki poziom edytorski rozprawy. W oparciu o uważną lekturę, mógłbym zaproponować Autorce dosłownie kilka drobnych korekt. Oto ich lista:



1. Str. 15., 7. wiersz od góry, zamiast „Wtedy wracają”, „Wtedy wracają”,
2. str. 15., 11. wiersz od dołu, „niewielkie” zamiast „niewielki”,
3. str. 19., 3. wiersz tekstu, „wodzie” zamiast „wodnie”,
4. str. 43., 4. wiersz od góry, zamiast „18 μ ” proponuję 18 g/mol,
5. str. 53., podpis pod wzorem 38., „ g_m ” zamiast „ g_n ”,
6. str. 92., 2. wiersz od dołu, „głównie” zamiast „głównie”,
7. str. 101, 7. wiersz od góry, „Ryc. 39” zamiast „Ryc. 38”,
8. str. 149., 13. wiersz od góry, „układów biologicznych” w miejsce „układówbiologicznych”,
9. str. 154., 17. wiersz od góry, proponuję „31.5 KJ/mol” zamiast „31.5 kJ mole⁻¹”.

Tak zaawansowane i obszerne opracowanie, jakim jawi się rozprawa doktorska pani mgr Eweliny Baran, dostarcza wielu nowych oraz cennych informacji, rozbudzając jednocześnie ciekawość poznawczą. Wyrazem tego mogą być następujące pytania:

1. W rozprawie przedstawione zostały precyzyjne analizy zmian powierzchni ciała larwy w trakcie jej uwadniania (m.in. Ryc. 35, str. 96). Porównanie wyników eksperymentalnych z rezultatem dopasowania zależności teoretycznej, w oparciu o formułę reprezentowaną równaniem nr 129 wskazuje na trafność doboru tego modelu. Jednocześnie, spodziewać się należy, iż proces uwadniania będzie miał charakter reakcji osiągającej nasycenie, czego już nie przewiduje zastosowane równanie allometryczne. Czy pewne niewielkie, choć zauważalne odstępstwo punktów eksperymentalnych od zależności teoretycznej, dla czasów uwadniania powyżej 200 min. wiązać się może z osiąganiem stanu nasycenia procesu uwadniania larw?
2. Jeden z interesujących a jednocześnie intrygujących wyników dotyczy obserwacji, iż w larwach martwych nie daje się wyróżnić frakcji wody ściśle związanej oraz frakcji wody luźno związanej, na drodze analizy kinetyk hydratacji z fazy gazowej (str. 106). Ciekaw jestem, na ile wynik ten można uogólnić, na przykład przy dyskusji roli cząsteczek wody w stabilizacji funkcjonalnej biomolekuł?
3. Kolejna intrygująca, moim zdaniem, obserwacja dotyczy faktu, iż larwy uwodnione z fazy gazowej do poziomu ok. 20 % nie wykazywały aktywności życiowej po ich



umieszczeniu w wodzie, w odróżnieniu od larw uwadnianych z fazy gazowej przy niższych wilgotnościach względnych (str. 113). Ciekaw jestem jaki mógłby być bezpośredni mechanizm odpowiedzialny za taką różnicę?

4. Bardzo interesujące wydają mi się różnice, zaobserwowane w przypadku larw żywych oraz martwych, zależności hydratacyjnych całkowitego sygnału cieczowego wyrażonego w jednostkach sygnały stałego $(L_1+L_2)/S$ (str. 116-120). Okazuje się, iż zależność hydratacyjna w funkcji $\Delta m/m_0$ opisana być może funkcją wymierną w przypadku larw żywych (Ryc. 50) bądź funkcją liniową, w przypadku larw martwych (Ryc. 53). Ciekaw jestem, czy w obydwu przypadkach nie dało by się wyróżnić fazy pierwotnego plateau na poziomie wartości funkcji 0.5, w przedziale $\Delta m/m_0$ poniżej 0.08? Jeśli tak, to czy taki charakter zależności mógłby okazać się istotny z punktu widzenia zrozumienia procesu rehydratacji larw?

Formułując konkluzję chciałbym stwierdzić, iż pani mgr Ewelina Baran przedstawiła bardzo wartościową rozprawę doktorską, opierającą się na wynikach precyzyjnie zaprojektowanych oraz starannie przeprowadzonych prac eksperymentalnych. Miarą wysokiej jakości warsztatu naukowego Doktorantki jest również jej współautorstwo w szeregu oryginalnych publikacji naukowych w tematyce związanej bezpośrednio z projektem doktorskim czyli z hydratacją tkanek i struktur biologicznych. W mojej ocenie, rozprawa doktorska przedstawiona przez panią mgr Ewelinę Baran zawiera rozwiązania istotnych, oryginalnych wyzwań poznawczych spełniając w zupełności warunki określone w art. 13 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2014 r. poz. 1852 oraz z 2015 r. poz. 249 i 1767). W oparciu o powyższą konkluzję, uprzejmie wnoszę do Wysokiej Rady Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego o dopuszczenie pani mgr Eweliny Baran do dalszych etapów postępowania doktorskiego, w szczególności do publicznej obrony.