

Kraków, 22 marzec 2019

Dr hab. Władysław Węglarz, Prof. IFJ PAN
Zakład Tomografii Magnetyczno-Rezonansowej
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
w Krakowie

Recenzja pracy na stopień doktora nauk fizycznych, zatytułowanej „Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)”, autorstwa mgr Eweliny Baran, wykonanej pod opieką promotorów: dr hab. Huberta Harańczyka oraz dr hab. Stanisława Knutelskiego.

Celem przedstawionej mi do recenzji pracy doktorskiej było zbadanie mechanizmów rehydratacji larw ochotki afrykańskiej w różnych warunkach środowiskowych *ex situ*, od stanu anhydrobiozy, charakteryzującej się niemal całkowitym odwodnieniem i brakiem aktywności metabolicznej, do pełnego uwodnienia uwidaczniającego się rozpoczęciem aktywności życiowych.

Zagadnienie powrotu organizmu od stanu anhydrobiozy do pełni funkcji życiowych jest z pewnością zagadnieniem fascynującym w kontekście możliwości przetrwania organizmów w skrajnie niekorzystnych warunkach środowiskowych, związanych z okresowym brakiem wody. Większość organizmów ziemskich, które posiadają właściwości umożliwiające przejście w stan anhydrobiozy, a następnie powrót do pełni funkcji życiowych ma rozmiary nie przekraczające 1 mm. Wyjątkiem jest larwa ochotki afrykańskiej, która jest największym znanym organizmem anhydrobiotycznym na świecie, osiągając rozmiary 7-8 mm. Zatem, jest naturalnym wyborem dla badań związanych z warunkami występowania i mechanizmami anhydrobiozy.

Przedstawiona do oceny rozprawa jest zredagowana w logicznym porządku. Rozpoczyna się od krótkiego Wprowadzenia, w którym Doktorantka przedstawia tematykę i zawartość pracy. Na właściwą pracę składa się kilka rozdziałów: Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki, Dyskusja oraz Wnioski. W obszernym Wstępie Autorka w kolejnych czterech podrozdziałach przybliży czytelnikowi zagadnienie anhydrobiozy występującej w badanym obiekcie, omawia własności fizykochemiczne wody w kontekście układów biologicznych, przedstawia trzy rodzaje izotermy sorpcyjnej oraz podstawy teoretyczne magnetycznego rezonansu jądrowego. W kolejnym rozdziale Doktorantka omawia szczegółowo badany materiał oraz kilka wykorzystywanych przez nią technik pomiarowych. W ostatniej części przedstawia uzyskane przez siebie wyniki pomiarów mikroskopii elektronowej i optycznej oraz mikrotomografii CT, pomiary kinetyki hydratacji i dehydratacji oraz wyniki pomiarów relaksacyjnych i spektroskopowych magnetycznego rezonansu jądrowego larw ochotki afrykańskiej na różnych etapach rehydratacji. W obszernej dyskusji porównuje otrzymane wyniki z wynikami dla innych materiałów biologicznych, zaś we Wnioski stanowią zwięzłe podsumowanie osiągnięć pracy. Rozprawa zakończona jest spisem literatury, spisem publikacji i wystąpień konferencyjnych Doktorantki oraz spisem rysunków i tabel. Całość rozprawy zawarta jest na 176 stronach, zawiera 78 rysunków i 13 tabel a także odniesienia do 196 pozycji literaturowych.

W rozdziale 1.1 Doktorantka szczegółowo opisuje systematykę gatunkową oraz cykl rozwojowy ochotki afrykańskiej, aby następnie przejść do opisu badań stanu anhydrobiozy, w tym znaczenia sposobu odwadniania organizmu w pomyślnym przejściu do tego stanu. Kolejne podrozdziały poświęcone są roli trehalozy, cukru którego zgromadzenie w odpowiedniej ilości w tkankach jest niezbędne dla uzyskania stanu odwracalnej anhydrobiozy. Autorka omawia też niezależność indukcji anhydrobiozy od centralnego układu nerwowego, odpowiedzi organizmu na stres oksydacyjny związany z odwodnieniem komórek, rolę specyficznych białek oraz akwaporyn – kanałów wodnych ułatwiających transport wody przez błony komórkowe. Na koniec tego rozdziału Autorka krótko omawia porównanie genomów ochotki afrykańskiej oraz innego, wrażliwego na odwodnienie gatunku a także omawia pokrewieństwo filogenetyczne z innymi gatunkami, wskazując na możliwości badawcze nad mechanizmami prowadzącymi do stanu anhydrobiozy. Zawartość tego rozdziału świadczy o szerokiej znajomości bieżącego stanu wiedzy naukowej na temat anhydrobiozy generalnie, a w szczególności występującej u będącej przedmiotem rozprawy larwy ochotki afrykańskiej.

W rozdziale 1.2 Doktorantka bardzo zwięźle omawia budowę molekularną wody oraz jej własności fizykochemiczne w kontekście układów biologicznych.

W rozdziale 1.3 Doktorantka szczegółowo omawia trzy modele służące do opisu izoterm sorpcyjnej, to jest kolejno model izoterm Langmuira, BET oraz Denta, opisujących w sposób coraz bardziej dokładny zjawisko adsorpcji wody do powierzchni. W szczególności omawia ona dwie formy parametryzacji/prezentacji modelu, z których tzw. forma paraboliczna pozwala na stosunkowo łatwą interpretację uzyskanych wyników doświadczalnych. Rozdział ten zredagowany jest precyzyjnie pozwalając na zrozumienia teorii tej metodologii, w zakresie wykorzystywanym w rozprawie doktorskiej. Ilościowe wyprowadzenie końcowych formuł stosowanych do parametryzacji izoterm wskazuje na dogłębną znajomość przez Doktorantkę tego zagadnienia.

Ostatni w części teoretycznej rozdział 1.4 zawiera elementy teorii magnetycznego rezonansu jądrowego obejmujące zagadnienia takie jak moment magnetyczny jądra, magnetyzację jądrową, precesję Larmora, równania Blocha oraz procesy relaksacyjne a także czasy korelacji ruchów molekularnych, przedstawione w ujęciu półklasycznym. Kolejne podrozdziały zawierają opis kwantowego ujęcia magnetycznego rezonansu jądrowego i procesów relaksacji, w oparciu o równania ruchu operatora gęstości spinowej oraz omówienie oddziaływań opisanych przez hamiltonian jądra. W dalszej części tego rozdziału Autorka opisuje teoretyczne podstawy pomiarów MRJ w domenie czasu i częstości, w tym powstawanie sygnału zaniku swobodnej precesji (FID), transformatę Fouriera wiążącą domeny czasu i częstości oraz funkcje służące do opisu sygnału od spinów w ciałach stałych i cieczech. Rozdział ten jest dość obszerny i dokładnie zredagowany omawiając tematykę konieczną do zrozumienia stosowanych przez Doktorantkę technik MRJ, w zakresie pomiarów i analizy danych. Moje uwagi do tego rozdziału dotyczą dwu stwierdzeń, które wymagają korekty: pierwsza na str. 52 gdzie Doktorantka pisze że (domyślnie w eksperymentach MRJ) „rejestruje się promieniowanie elektromagnetyczne”, podczas gdy w rzeczywistości rejestrowana jest ewolucja magnetyzacji co generuje siłę elektromotoryczną w cewce RF, co zresztą jest wyjaśniane w dalszej części tego rozdziału. Drugie nie do końca precyzyjne stwierdzenie występuje na str. 53, gdzie Doktorantka stwierdza że „wszystkie jądra atomowe złożone z nieparzystej liczby nukleonów posiadają niezerowy spin jądrowy”, co jest prawdą, ale jak wiadomo niektóre jądra o parzystej sumarycznej liczbie nukleonów, przykładowo ${}^6\text{Li}$, ${}^{10}\text{B}$ czy ${}^{14}\text{N}$ również mają niezerowy spin i mogą być wykorzystywane w eksperymentach MRJ.

Część druga rozprawy doktorskiej Materiały i Metody zawiera zwięzły opis materiału badawczego którym były larwy ohotki afrykańskiej dostarczone w stanie anhydrobiozy, a także opis wykorzystywanych metod pomiarowych i obrazowych. Wyznaczanie suchej masy próbek, ich poziomu uwodnienia, kinetyki hydratacji i dehydratacji oraz izoterm sorpcyjnej Doktorantka dokonywała poprzez pomiary grawimetryczne masy larw uwadnianych z fazy gazowej w warunkach kontrolowanej wilgotności względnej. W tym celu wykorzystywała roztwory soli nasyconych oraz żel krzemionkowy i wodę, co pozwoliło wykonać badania w całym zakresie wilgotności względnych (0 – 100 %).

Kolejne części tego rozdziału Autorka poświęciła metodyce pomiarów metodami magnetycznego rezonansu jądrowego w domenie czasu w polu 0.7 T oraz w domenie częstotliwości w polu 7,05 T, a także opisowi metodologii badań wykonanych techniką skaningowej mikroskopii elektronowej (SEM), mikrotomografii komputerowej oraz morfometrii z wykorzystaniem mikroskopii optycznej larw uwadnianych z fazy ciekłej. Rozdział zakończony jest krótkim omówieniem oprogramowania wykorzystywanego do analizy danych. W stosunkowo najbardziej obszernym opisie metodologii badań przy pomocy technik MRJ, Doktorantka omawia pomiary i analizę czasów zaniku sygnału swobodnej precesji (FID) dla jąder wodoru w polu 0.7T a także widm ^1H NMR oraz pomiarów czasu relaksacji T_2 metodą CPMG i czasu T_1 metodą zaniku inwersji (spektroskopii relaksacyjnej) w polu 7.05 T. W rozdziale tym Doktorantka opisuje też używaną aparaturę: spektrometr impulsowy WNS HB65 firmy Waterloo NMR Spectrometers używany do pomiarów w niskim polu magnetycznym oraz spektrometr Bruker Avance III 300 MHz używany do rejestracji widm w wysokim polu magnetycznym. Rozdział ten zredagowany jest dość zwięźle, ale wystarczająco dokładnie dla uzyskania informacji o wykorzystanej przez Doktorantkę metodologii badawczej. Drobną moją uwagę dotyczy ryc. 21b, na której amplituda sygnału echa spinowego po impulsie π jest przedstawiona w takiej samej wysokości jak początkowa amplituda sygnału FID po impulsie $\pi/2$, co sugeruje wprost że mierzony czas relaksacji T_2 jest nieskończenie długi, lub co najmniej znacznie dłuższy od czasu 2τ . Jak wiadomo w takich warunkach pomiar T_2 nie miałby większego sensu. Mam też uwagę do użytej terminologii, jako że echem Hahna w magnetycznym rezonansie jądrowym zazwyczaj określa się echo generowane po zastosowaniu ciągu dwu impulsów RF innych niż $\pi/2 - \tau - \pi$. Zaś w oryginalnej pracy Hahna z 1950 roku, na którą Doktorantka się powołuje analizowany jest efekt działania dwu identycznych impulsów $\pi/2 - \tau - \pi/2$. Sądzę że intencją Autorki było pokazanie że do pomiarów relaksacyjnych używała uproszczonej wersji sekwencji CPMG (lub CP – w zależności od fazy impulsu π), ograniczonej do dwu impulsów RF, co było prostsze w użyciu niż pełna sekwencja CPMG, wymagająca bardzo precyzyjnego ustawienia parametrów impulsów i dodatkowego zmodyfikowania przebiegu czasowego w przypadku konieczności wykonania pomiarów z różnymi odstępami między mierzonymi echemi.

Trzecia część rozprawy zawiera omówienie wyników badań własnych Doktorantki. W pierwszym rozdziale tej części przedstawia mikrogramy SEM żywych larw uzyskane na różnych etapach uwodnienia z fazy ciekłej, dyskutując zauważone zmiany. W kolejnym rozdziale przedstawia wyniki uzyskane przy pomocy mikrotomografii rentgenowskiej, co pozwoliło na określenie schematu morfologicznego suchej larwy, jak również na zaobserwowanie zróżnicowania szybkości uwadniania jej wewnętrznych tkanek. Dokładniejsze pomiary morfometryczne zmian przekroju oraz długości ciała larwy podczas hydratacji Doktorantka wykonała posługując się mikroskopem optycznym. Zaobserwowała różnice w szybkości uwadniania zależne od rodzaju użytej wody (destylowana, kranowa lub mineralna) oraz od faktu czy uwadniane larwy były żywe czy martwe. Moja drobna uwaga do

tego rozdziału jest taka, że sądząc z opisu pozyskiwania danych liczbowych, na wykresach prezentowane jest raczej pole przekroju ciała larwy a nie pole jej powierzchni.

Kolejny rozdział zawiera wyniki pomiarów kinetyki hydratacji i izotermy sorpcyjnej larw ochotki afrykańskiej uwadnianych z fazy gazowej w atmosferze o kontrolowanej wilgotności. Dla niskich wilgotności względnych zarówno dla żywych jak i martwych larw Doktorantka zaobserwowała anomalne eksponencjalne zmniejszenie masy w czasie hydratacji, po wstępnym szybkim jej wzroście. Zinterpretowała to jako efekt aktywności trawiennych bakterii obecnych w ciele larw. Kinetykę hydratacji w tym zakresie opisała parametrami dopasowanej funkcji eksponencjalnej. Nasuwa się tu komentarz że jeśli jest to prawdziwa hipoteza to należałoby tę zależność nazwać raczej kinetyką trawienia niż kinetyką hydratacji. Moją wątpliwość budzi interpretacja parametru A_{10}^h na str. 102, jako poziomu hydratacji dla wilgotności względnej $h=0\%$. Raczej jest to maksymalna hydratacja osiągnięta zanim procesy trawienne zaczęły przeważać. Szkoda że Doktorantka nie pokusiła się o dopasowanie również tej początkowej, typowej kinetyki hydratacji i „zszycia” obydwu zależności w chwili t^h , co być może pozwoliłoby na wyciągnięcie dokładniejszych wniosków co do związku względnego uwodnienia z rozpoczęciem procesów trawienia. Dla larw żywych w wyższych wilgotnościach względnych uwadniania z fazy gazowej kinetyka hydratacji jest typowa, opisywana jedną lub dwoma eksponentami (przy $h \geq 93\%$). Dla larw martwych w całym zakresie wilgotności względnych zależność hydratacyjna jest jedno-eksponencjalna, zaś całkowity poziom uwodnienia jest niższy niż dla larw żywych. W ostatnim podrozdziale Doktorantka zamieściła wyniki dopasowań parametrów izotermy sorpcyjnej w wersji standardowej i parabolicznej dla modeli BET i Denta, wskazując słusznie na ten drugi model jako właściwy do opisu otrzymanych danych hydratacyjnych zarówno dla larw żywych jak i martwych.

Ostatnie dwa najbardziej obszerne rozdziały tej części, zawierają wyniki badań relaksacyjnych i spektroskopowych magnetycznego rezonansu uzyskanych w niskim i wysokim polu magnetycznym. W rozdziale 3.5 Doktorantka przedstawia wyniki pomiarów magnetycznej relaksacji jądrowej ^1H NMR w polu 0,6 T dla żywych oraz martwych larw, uzyskane na podstawie analizy sygnału swobodnej precesji, dla wzrastających uwodnień. W sygnale FID wyodrębniła składową pochodzącą od ciała stałego, opisaną zanikiem gaussowskim oraz dwie składowe pochodzące od protonów mobilnych (wody związanej o różnej ruchliwości) opisane funkcjami eksponencjalnymi. Następnie przedstawiła zależność hydratacyjną sumarycznego sygnału cieczowego FID wyrażonego w jednostkach sygnału od protonów ciała stałego w funkcji względnego przyrostu masy. Stwierdziła nieliniową zależność w przypadku larw żywych, zaś liniową w przypadku martwych, co przedstawiła odpowiednio na rycinach 50 i 53. Porównując te wykresy, mam wątpliwości czy przedstawione na nich wyniki pomiarowe są na tyle różne, aby w pierwszym przypadku dopasować do nich funkcję wymierną zaś w drugim przypadku prostą. W obydwu przypadkach w zależności hydratacyjnej można wyróżnić trzy obszary: dla $\Delta m/m_0 < 0.07$ zależność jest liniowa zaś wzrost sygnału cieczowego jest stosunkowo niewielki, dla zakresu $0.07 < \Delta m/m_0 < 0.1$ następuje bardzo znaczący względny przyrost sygnału cieczowego, z kolei dla wyższych hydratacji przyrost sygnału cieczowego jest umiarkowany i raczej liniowy. Jest to zależność typowa w przypadku uwadniania matrycy stałej, zawierającej frakcję rozpuszczalną. Niestety, brak jest zaznaczonych na wykresach błędów pomiarów sygnału oraz przyrostu masy, co nie ułatwia interpretacji zależności obserwowanej dla tych danych pomiarowych. Również ograniczona liczba punktów pomiarowych w obszarze dużej zmienności sygnału cieczowego nie jest w interpretacji pomocna. Dopasowanie do wykresu na ryc. 50 funkcji wymiernej, zaś do wykresu na ryc. 53 funkcji liniowej nie jest przekonywująco uzasadnione w tekście. Doktorantka powinna wyjaśnić, dlaczego dokonała

takiego wyboru dwu różnych funkcji opisujących zależności hydratacyjne, a w szczególności pokazać statystyczne miary jakości dopasowania wybranego modelu w porównaniu z drugim.

W rozdziale 3.6 Doktorantka przedstawia wyniki badań wpływu uwodnienia i temperatury na zależność hydratacyjną kształtu widm $^1\text{H-NMR}$ w polu 7T (300MHz), dla larw żywych i martwych. Widma opisała przy pomocy składowej gaussowskiej od protonów ciała stałego oraz wąskiej linii lorentzowskiej pochodzącej od protonów wody. Przedstawiając zależności hydratacyjne analogicznie jak dla pomiarów w niskim polu, wykonała dopasowanie funkcji wymiernej w przypadku larw żywych, zaś funkcji liniowej dla przypadku larw martwych. Około dwukrotnie większa liczba punktów pomiarowych niż w przypadku wyników uzyskanych w niskim polu, pozwalałaby z większą wiarygodnością wybrać właściwy model opisujący zależności hydratacyjne, gdyby nie stosunkowo duży rozrzut wartości względnych udziałów składowej cieczowej. Przy dokładnym przyjrzeniu się wynikom przedstawionym na ryc. 58 i 63, można dojść do wniosku że możliwa jest interpretacja wskazująca na szybki przyrost składowej cieczowej dla pośrednich wartości przyrostu masy, zaś wolniejszy dla niskich i wysokich (w zakresie przedstawionym na wykresach) przyrostów masy. Opis analityczny takiego przebiegu mógłby mieć formę funkcji liniowej w zakresie niskich uwodnień, funkcji wymiernej w pośrednim oraz ponownie liniowej dla wysokich uwodnień lub krzywą o charakterze sigmoidalnym. Wydaje się że taki opis dałby większą szansę na ilościowe powiązanie wartości parametrów dopasowania z parametrami fizykochemicznymi substancji zawartych w ciele larwy (jak np. trehaloza), takimi jak gęstość protonowa, rozpuszczalność czy względna całkowita zawartość w suchej masie. W tym kontekście zachodzi pytanie o stosunkowo duże rozrzuty wartości parametrów opisujących składowe mierzone widm. Czy jest to skutek zbyt małej liczby akwizycji (a więc niskiego SNR) czy być może trudności analizy danych. Np. położenia środków linii zwłaszcza dla składowej gaussowskiej wykazują znaczące rozrzuty, co może świadczyć bądź to o problemach z poprawnym fazowaniem widm lub kształtem linii bazowej, co w konsekwencji może prowadzić do pogorszenia wyników dopasowania kształtu widm i tym samym zależności hydratacyjnych.

W kolejnym podrozdziale Doktorantka prezentuje interesujące wyniki analizy widma $^1\text{H-NMR}$ dla żywych larw, uwodnionych z fazy ciekłej, do którego dopasowała pięć linii różniących się częstością centralną i szerokością połówkową. Różnice parametrów poszczególnych linii widmowych wskazują na zróżnicowanie mobilności wody w ciele nawodnionych larw, przy czym częstości centralne linii widmowych $L_1 - L_3$ pokrywają się częściowo z zakresem częstości linii lorentzowskiej w widmach larw uwadnianych z fazy gazowej, przedstawionych we wcześniejszych rozdziałach. Tu pojawia się pytanie jak można zinterpretować podobieństwa i różnice w parametrach dopasowania linii lorentzowskich dla larw uwadnianych z fazy ciekłej i gazowej, w szczególności na ile podukłady wody, obserwowane w obydwu przypadkach są tożsame. Szkoda że Doktorantka nie zdecydowała się na wykonanie pomiarów czasów T_1 (spektroskopii relaksacyjnej) w tym przypadku, co być może pozwoliłoby na dokładniejszą interpretację podukładów wody odpowiadających poszczególnym liniom widma. W szczególności czy są one w reżimie szybkiej wymiany, sugerującej ciągłość morfologiczną, czy być może niektóre z podukładów formują odizolowane od innych klastry.

W kolejnych dwu podrozdziałach pokazane są wyniki pomiarów temperaturowych w zakresie 230-295 K widm larw. Wyniki przedstawione w formie stosunku pól powierzchni linii lorentzowskiej do gaussowskiej w zależności od temperatury, wskazują na niekooperatywne unieruchamianie molekuł wody wraz ze spadkiem temperatury.

Ostatni podrozdział tej części rozprawy dotyczy pomiarów temperaturowych czasów relaksacji spinowo-sieciowej (spektroskopii relaksacyjnej) dla żywych i martwych larw. Uzyskane wyniki wskazują na istotne różnice w charakterze zależności oddziaływań pomiędzy protonami podukładu wody a matrycą stałą tkanek w zależności od tego czy dotyczy to larw żywych czy martwych. O ile w przypadku larw żywych w wyższych temperaturach podukłady te są w reżimie szybkiej wymiany, co zmienia się na wymianę pośrednią w temperaturach niższych to dla larw martwych w całym zakresie temperatur obserwowana jest wymiana pośrednia.

Kolejna część rozprawy poświęcona jest obszernej dyskusji, przeprowadzonej w kontekście wyników uzyskanych dla innych materiałów przy pomocy podobnej metodologii eksperymentalnej. Tak jak pozostała część pracy ta również zredagowana jest czytelnie i ze znajomością innych prac promotora dotyczących hydratacji układów porowatych o niskiej zawartości wody.

W ostatniej tekstowej części rozprawy zawarte są zwięzłe i jasno sformułowane wnioski wynikające z przeprowadzonych badań.

Podstawowym osiągnięciem Doktorantki w przedstawionej pracy było wykonanie systematycznych pomiarów i analizy danych dla hydratacji żywych i martwych larw ochotki afrykańskiej. Uzyskane wyniki pozwoliły na określenie szeregu podobieństw i różnic między nimi, co niewątpliwie jest istotnym wkładem w zrozumienie procesów decydujących o sukcesie „powrotu do życia” ze stanu anhydrobiozy. Można zatem uznać że cel jaki Doktorantka miała przed sobą postawiony został zrealizowany. Dodatkowo, na podkreślenie zasługuje fakt, że Doktorantka jest współautorką sześciu publikacji związanych z badanymi zagadnieniami, co również świadczy o jej zaangażowaniu w prace związane z tematyką rozprawy doktorskiej.

Rozprawa zredagowana jest bardzo starannie i czytelnie. Nieliczne w porównaniu z innymi pracami które przyszło mi recenzować, drobne uchybienia redakcyjne, w niczym nie umniejszają jej wartości. Zaś uwagi merytoryczne do niektórych fragmentów rozprawy, które przedstawiłem wcześniej, należy potraktować w większości przypadków raczej jako głos w dyskusji dotyczącej możliwych interpretacji uzyskanych wyników aniżeli jako ich krytykę.

Reasumując, biorąc pod uwagę zarówno merytoryczną zawartość pracy jak i jej stronę redakcyjną stwierdzam że przedstawiona przez mgr Ewelinę Baran rozprawa doktorska zatytułowana „Rehydratacja anhydrobiotycznych larw ochotki afrykańskiej, *Polypedilum vanderplanki* Hinton, 1951 *ex situ* (Diptera: Chironomidae)” spełnia wymogi Ustawy o stopniach naukowych i tytułach naukowych, która stwierdza że rozprawa powinna stanowić oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz wykazywać ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w danej dziedzinie naukowej a także umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej. Zatem wnoszę o dopuszczenie mgr Eweliny Baran do dalszych etapów przewodu doktorskiego.