



Warszawa, 4 października 2022

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kurek

Praca doktorska Pani Agnieszki Kurek zatytułowana „Mikroskopia Sił Atomowych w diagnostyce chorób macicy w oparciu o właściwości mechaniczne tkanki endometrium” miała na celu aplikację wybranych metod spektroskopii sił z użyciem mikroskopii sił atomowych (AFM) do oceny i ewentualnej przyszłej dyskryminacji patofizjologicznej powikłań ze spektrum endometriozy. W szczególności przeprowadzone zostały pomiary wybranego parametru mechanicznego tj. modułu Younga na tkankach pobranych w wyniku biopsji punktowych od pacjentek z zaburzeniami ze spektrum endometriozy. Otrzymane rezultaty nie okazały się niestety dyskryminujące ze względu na charakter powikłań, a dodatkowo przeprowadzone symulacje komputerowe zależności modułu Younga od uproszczonego modelu komórek w badanych tkankach nie znalazły odniesienia do otrzymanych eksperymentalnie rezultatów. Niemniej jednak problem badawczy jest rzeczywiście skomplikowany i w opinii Recenzenta, praca mimo wielu niedociągnięć stanowi mimo wszystko pierwszy krok naprzód w celu przyszłego użycia opisanych powyżej metod w diagnostyce klinicznej.

Do pracy doktorskiej zostało włączonych 17 preparatów tkankowych pobranych od pacjentek oznaczonych liczbami od 1 do 24. Na dużą pochwałę zasługuje duża ilość badań AFM przeprowadzonych przez Doktorantkę dla każdej z pacjentek. Liczba pojedynczych badań spektroskopii sił na każdej z zaprezentowanych w pracy pięciu próbkach wynosiła co najmniej parę set. Zapewne w pozostałych 12. przypadkach było podobnie. Na pozytywną opinię zasługuje również prezentacja wyników nie za pomocą średnich, a za pomocą histogramów, gdyż tylko takie podejście pozwala zobrazować rzeczywisty rozrzut i obecność rozmaitych sub-populacji danych, które z kolei odzwierciedlają niejednorodny charakter tkanki jak i niejednorodności występowania zmian w pobranym materiale.

Doktorantka prawidłowo podzieliła rodzaj obserwowanych zmian w Tabeli 4 na trzy klasy. Niemniej jednak nie zostało opisane dlaczego do pracy włączono tylko siedemnaście próbek z dwudziestu czterech. Ponadto, dla kompletności opisu brakuje pomiarów odniesienia dla pacjentek zdrowych, co jednakże nie powinno stanowić powodu do krytyki, gdyż uzyskanie takowego materiału badawczego jest zapewne szczególnie trudne. Ze względu na heterogeniczność badanych tkanek, a w szczególności spodziewaną zależność otrzymanych wyników od skali próbkowania, na pochwałę zasługuje przeprowadzenie pomiarów w dwóch skalach promienia kontaktu między ostrzem próbkującej sondy AFM a tkanką. W szczególności, Doktorantka przeprowadziła pomiary zarówno za pomocą typowych ostrz AFM w kształcie piramidy i o promieniach kontaktu w skalach kilku do kilkudziesięciu nanometrów, jak i za pomocą zmodyfikowanych sond z przyklejonymi przez Doktorantkę kulkami szklanymi z promieniami kontaktu zapewne między dziesiątkami nanometrów do sub-mikrometrów i znacznie mniejszymi ciśnieniami wywieranymi w strefie kontaktu niż niezmodyfikowane ostrza.

Mimo niewątpliwych zalet otrzymane dane pomiarowe jak i ich analiza zawierają wiele niedociągnięć, z których trzy najistotniejsze opisuję poniżej. Pierwsze z nich związane jest z kalibracją krzywych siła-przesunięcie, a w szczególności wartościami stałych siłowych



użytych sond AFM. Drugie związane jest ze sposobem otrzymania modułów Younga z krzywych siła-przesunięcie. Trzecie związane jest z dedukcją prawidłowych wartości modułów Younga z ich histogramów. Powyższe niedociągnięcia stanowić mogą, ale nie muszą (gdyż z zaprezentowanych danych nie jest możliwe stosowne oszacowanie), błędy grube, które przy głębszym spojrzeniu pozwoliłyby być może wysnuć nieco inne wnioski badawcze, niż otrzymane przez Kandydatkę.

W odniesieniu do stałych siłowych użytych sond AFM: nie zostało opisane jak kalibrowane były stałe siłowe użytych ostrzy, zarówno komercyjnych jak i zmodyfikowanych. Wartości te zmieniają się bardzo mocno między próbnikami i stanowią jedną z głównych przyczyn rozbieżności między otrzymywanymi danymi eksperymentalnymi, w szczególności gdy jeden rodzaj próbki jest mierzony kilkoma ostrzami, co czasem jest konieczne. W Tabeli 5 pojawia się co prawda informacja o zakresie stałych siłowych użytych sond, ale brak jest dokładniejszych informacji skąd są te dane i jak się one mają do wartości podanych przez producenta. W szczególności niepokój budzi brak dyskusji nt. otrzymania wartości stałych siłowych dla zmodyfikowanych przez Doktorantkę sond z kulkami, gdyż w tym przypadku nastąpiła nie tylko zmiana częstotliwości rezonansowej, ale również i geometrii próbника, a więc zmianie ulega równanie pozwalające otrzymać sztywność z pomiaru częstotliwości rezonansowej sondy.

Kolejnymi problemami są błędne równania użyte do dopasowywania krzywych siła-przesunięcie, a więc równania 8 i 9. Równanie nr. 8 nie tylko jest błędne (nie podaje zależności siły od indentacji do potęgi $3/2$), ale również nie odpowiada w ogóle użytym referencjom tj. referencjom nr 214 i 215, które nawiasem mówiąc również nie są właściwymi referencjami w kontekście tej pracy doktorskiej. Praca nr 214 przytacza co prawda równania modelu mechaniki kontaktu JKRS /równania nr 1-3 tamże/, ale z błędami i nie jest ani oryginalną pracą twórców metody JKRS (Johnson-Kendall-Roberts-Sperling), ani uznaną pracą przeglądową w dziedzinie mechaniki kontaktu. Praca nr 215 nie jest w ogóle cytowana i również zawiera błędy w równaniach metody JKR /równanie nr 1 tamże/. Dla uzupełnienia model JKR (Johnson-Kendall-Roberts) stanowi prekursor modelu JKRS. Jak wspomniano powyżej bibliografia powinna zawierać albo odniesienia do oryginalnych publikacji w/w modeli mechaniki kontaktu, bądź do uznanych na tym polu badawczym opracowań jak np. „Forces between a stiff and a soft surface” autorstwa H.-J. Butt-a et al., czy innych wysoko cytowanych opracowań, gdzie oryginalne równania metody JKR są przytoczone bez błędów. Jeśli równanie nr 8 zostało użyte w przytoczonej błędnej formie do otrzymania modułów Younga dla indentacji próbnikami z kulką, to otrzymane wyniki są błędne. Ponadto, metody JKR/JKRS nadają się do opisu elastycznego kontaktu, podczas gdy otrzymane przez Doktorantkę krzywe siła-przesunięcie, jak np. na rys. 29 w pracy, są przykładami kontaktu z odkształceniami wisko-elastycznymi lub/i plastycznymi, gdyż pojawia się charakterystyczne rozwarcie między krzywymi dochodzenia i odchodzenia do próbki w trakcie jej indentacji. W takim przypadku najczęściej otrzymuje się moduł Younga z nachylenia początkowej fazy krzywej odchodzenia od kontaktu po maksymalnej indentacji, przy czym jest tam również szereg potencjalnych kłopotów, które nie zostały przedyskutowane, a zapewne pozwoliłoby to na otrzymanie dużo większej precyzji analizowanych modułów Younga. Ponadto, w równaniu nr 9, a więc użytym do modelowania sneddonowskiej mechaniki kontaktu dla ostrych próbników również pojawia się błąd, przy czym tym razem jedynie w pre-faktorze, który zamiast „ $3/4$ ” powinien raczej być „ $2/\pi$ ”. Ten błąd najprawdopodobniej spowodował jedynie nieznaczące niedoszacowanie mierzonych modułów Younga, które być może również i



tym razem powinny zostać wyznaczone w inny sposób niż opisany przez Kandydatkę. Odpowiedz na to pytanie nie jest jednak możliwa na gruncie zaprezentowanej pracy, gdyż brakuje w niej przykładowej krzywej siła-przesunięcie otrzymanej dla próbników z ostrzem piramidalnym. Stąd też rys. 29 powinien zostać uzupełniony o analogiczny rysunek otrzymany w wyżej diskutowanym przypadku. Ewentualnie powinien pojawić się Appendix z takimi rysunkami.

Ostatnim poważnym zastrzeżeniem co do metody otrzymania modułów Younga dla badanych próbek jest ich dedukcja z otrzymanych histogramów. Jak zostało wspomniane powyżej samo użycie histogramów zamiast wartości średnich jest poprawne, niemniej jednak sposób wyboru danych użyty przez Autorkę zawiera szereg niedociągnięć. Przede wszystkim, ponieważ są to kluczowe dane w pracy, to w opinii Recenzenta, powinny zostać zaprezentowane wszystkie 17x2 (=34) histogramy, jeśli nie w pracy głównej, to w dodatku. W ten sposób czytelnik dostałby możliwość samodzielnej krytycznej interpretacji danych. Na dzień dzisiejszy pojawiają się jedynie przykładowe i niepełne dane dla pięciu pacjentek (p1, p3, p12, p21 i p24). Ponadto, ze względu na wielopopulacyjne rozkłady w/w histogramów konkretne wybrane dane powinny być dopasowane choćby za pomocą modeli Gaussa czy Poissona. Warto by również skoncentrować się na porównaniach względem danej grupy Pacjentek ujętych w Tabeli 4. Tutaj, w szczególności warto by rozwinąć sugestię proponowaną przez Doktorantkę i poszukać piku od zdrowych tkanek w obrębie wszystkich histogramów w danej klasie. Być może rzeczywiście występuje on przy wartościach ok. 100 kPa dla wszystkich badanych próbek w klasie „polipy” i badanych z ostrymi sondami AFM? Ponadto, mimo, iż dalsza analiza zaproponowana przez Autorkę, tj. porównująca iloraz modułów Younga otrzymanych za pomocą sond ostrych i kulkowych wydaje się ciekawa, to zabrakło analizy błędów. Taka analiza zapewne spowodowałaby wykluczenie tej metody interpretacji danych na korzyść szczegółowej i osobnej interpretacji danych uzyskanych za pomocą próbników z ostrzami piramidalnymi i kulkowymi. Na gruncie powyższej dyskusji proponuję uzupełnienie pracy doktorskiej o prezentację i dokładniejszą analizę wszystkich otrzymanych danych badawczych, z choćby pobieżną analizą błędów.

Po recenzji rezultatów eksperymentalnych chciałbym się również odnieść do rezultatów otrzymanych za pomocą modelowania. Dane użyte do modelowania komórki wydają się rozsądne, choć należałoby je uzupełnić o referencje do uznanych publikacji bądź opracowań naukowych, których w tej sekcji brakuje. Autorka na wstępie testowała czy użycie metody elementów skończonych odtworzy rezultaty indentacji definiowane modelem Hertza mechaniki kontaktu, a w szczególności, przy jakich warunkach otrzymany zostanie wykładnik $(3/2)$ zależności siły od indentacji dla komórki potraktowanej jako układ dwuskładnikowy, tj. składający się z korteksu i cytoplazmy. Argument, iż model Hertza jest spodziewany wynika przede wszystkim z równań mechanicznych użytych w modelach elementów skończonych dla dużych promieni kontaktu. Stąd też zapewne ciekawsze byłyby wyniki wypadkowych modułów Younga dla różnych grubości korteksu, bo takowe miałyby bezpośrednie odniesienie do pracy i być może również pomogły wyjaśnić pewne rozbieżności między danymi eksperymentalnymi na gruncie różnic między grubościami korteksu. I rzeczywiście Autorka przeprowadza również i takie symulacje, których wyniki pokazują, iż dla ustalonego modułu Younga cytoplazmy sumaryczny zredukowany moduł Younga zawierający korteks i cytoplazmę jest w stanie zmieniać się nawet o 30% w zależności od głębokości indentacji (rys. 44). Niemniej jednak zabrakło odniesienia użytych równań (równania 12, 13) jak i testowanych parametrów dla korteksu i cytoplazmy do danych literaturowych. Nie jest



również jasne dlaczego Autorka użyła równań 12 i 13 i co z tego wynika w kontekście pracy. Na tym tle interesujące wydają się odstępstwa od zależności Hertza spowodowane faktem, że przy zmieniającej się indentacji wzajemne przyczynki korteksu i cytoplazmy się zmieniają, co powoduje zmianę pre-faktora „A” w równaniu 11 w pracy, która z kolei jest równoważna stałemu „A” i zmiennemu wykładnikowi „n”. Co więcej można by było się również pokusić również o ocenę wpływu modułów Poissona korteksu i cytoplazmy.

Na koniec odniosę się do układu i struktury pracy. Praca składa się z dziewięciu rozdziałów, które są wystarczające zarówno do wprowadzenia w tematykę badawczą (rozdziały 1-4) jak i do prezentacji użytych technik badawczych tj. spektroskopii sił z użyciem mikroskopii sił atomowych oraz symulacji komputerowych za pomocą metod elementów skończonych (rozdziały 5-6). Niemniej jednak właściwa i najważniejsza część pracy tj. opis użytych materiałów i metod (rozdziały 7.1 – 7.2) jak i – przede wszystkim - otrzymane rezultaty badawcze wraz z ich podsumowaniem (rozdziały 7.3 oraz 8) stanowią tylko niewielki ułamek pracy. W szczególności rozdziały te zajmują jedynie nieco ponad 20 stron tekstu wobec ponad 60 stron wstępów i opisów w rozdziałach wcześniejszych. Wyniki badań powinny być opisane obszerniej i w opinii Recenzenta – jako najważniejsza część pracy - zasługują na bycie osobnym rozdziałem a nie podrozdziałem nr 7.3. Bibliografia (rozdział 9) powinna również być kompletniejsza (*vide* uwagi powyżej). W bardzo obszernym wstępie pojawia się również trochę błędów i nieścisłości. Poniżej wybrane z nich:

Wykaz akronimów: ATP – niepotrzebne „u” w ...trójfosforanu; skrót FEM: niepoprawny; FSH – brak angielskiej nazwy; FTIR: błędny skrót: spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera a nie: „spektrofotometrii w podczerwieni z transformacją fourierowską”; RNA: kwas ... a nie „kwasy...”; WT1 „Williams” a nie „Wilms...”

Wykaz skrótów: „F” ma wiele znaczeń; epsilon – ma wiele znaczeń; wartości średnie oznaczone są kropkami, a nie kreskami (kropki często oznaczają pochodne). „s: wartość stosunku ostrze/kulka” – b. nieprecyzyjne, co Autorka miała na myśli? σ_{PK} : drugie naprężenie... w konfiguracji odniesienia? co Autorka miała na myśli? „E* : parametr niezależny od geometrii” Co Autorka miała na myśli? Czy nie jest to raczej zredukowany moduł Younga?

Rozdz. 2. Cel i zakres badań: Punkt „c” jest niejasny. „Opracowanie modeli obliczeniowych pojedynczej komórki...”? Co Autorka miała na myśli?

Rozdz. 3. Endometrium:

Autorka rozpoczyna od opisu warstw ściany macicy. Rysunek byłby przydatny.

Str. 19: „cew”, a czy nie powinno być „cewek”?

Strony 19-25: b. szczegółowy opis, nigdzie później niewykorzystany.

Strona 23: co znaczą sformułowania „ekspresja mRNA dla VEGF” oraz „ekspresja mRNA dla DNMT”? Wydają się one niepoprawne stylistycznie.

Strona 32: „ektopowej” zamiast „ekotopowej”

Strona 33: skrót „MOS”: termin użyty tylko raz; po co skrót? Takich sytuacji jest więcej.

Rozdz. 4

Str. 35: zdanie „Z tego względu...” jest niepoprawne stylistycznie (pozycja słowa „metod”).

Str. 39: niepoprawny opis spektroskopii Ramana i mikroskopii w podczerwieni.

Rozdz. 5

Str. 66: rys. 17, część b) nieprawidłowy lewy dolny panel: brak szerokości obiektu w odwzorowanym obrazie.

W konkluzji stwierdzam, że recenzowana rozprawa doktorska Pani Agnieszki Kurek jest oryginalnym osiągnięciem badawczym, choć niestety jej poziom naukowy nie zachwyca. Na moją opinię ma wpływ m.in. bardzo pobieżne i skrótowe potraktowanie prezentacji i analizy danych eksperymentalnych, które to części powinny być opisane znacznie głębiej wraz z prezentacją wszystkich otrzymanych danych eksperymentalnych i stosownymi odniesieniami literaturowymi. Istotny dodatek to symulacje komputerowe mające pomóc w interpretacji. Jednakże tu również zabrakło dyskusji i odniesień literaturowych. Pojawily się jednakże oryginalne sposoby prezentacji i analizy danych, a także próby ich zrozumienia na tle przeprowadzonych symulacji. Zabrakło zapewne czasu na dogłębne spojrzenie na problem badawczy, który w istocie jest skomplikowany ze względu na dużą ilość zmiennych jak i duży rozrzut otrzymanych danych. Jednakże, mimo niedociągnięć, Doktorantka osiągnęła założony cel pracy, tj. dokonała pomiarów właściwości mechanicznych rozmaitych tkanek pochodzących od pacjentek ze zmianami patologicznymi w obrębie endometrium, a także podjęła próby ich interpretacji wykazując przy tym, iż posiada umiejętność samodzielnego rozwiązywania trudnych zagadnień badawczych. Wykazała również zdolność logicznego wnioskowania. Stwierdzam zatem, że recenzowana rozprawa doktorska zgodnie z przepisami ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. (Dz. U z 2022 r. poz. 574 z późn. zm.) - *Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce*, spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim i wnioskuję do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Fizyczne AGH o dopuszczenie mgr inż. Agnieszki Kurek do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

Z wyrazami szacunku

Dr hab. Robert Szoszkiewicz, prof. ucz.

Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych

Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

ul. Żwirki i Wigury 101

02-089 Warszawa

