



Dr hab. inż. Tomasz Kobiela, prof. PW
Kierownik Laboratorium Badania Oddziaływań Biomolekularnych
Katedra Biotechnologii Środków Leczniczych i Kosmetyków
tomasz.kobiela@pw.edu.pl
<http://kobiela.ch.pw.edu.pl>

Warszawa, 11 października 2022 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kurek
pt. „Mikroskopia Sił Atomowych w diagnostyce chorób macicy w
oparciu o właściwości tkanki endometrium”**

Praca doktorska mgr inż. Agnieszki Kurek zatytułowana „Mikroskopia Sił Atomowych w diagnostyce chorób macicy w oparciu o właściwości tkanki endometrium” została zrealizowana w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk w Krakowie pod kierownictwem dr hab. inż. Jakuba Barbasza oraz w Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego pod kierownictwem prof. dr hab. n. med. Roberta Jacha. Mgr inż. Agnieszka Kurek ukończyła studia magisterskie na Wydziale Inżynierii i Technologii Chemicznej Politechniki Krakowskiej na kierunku Technologia Chemiczna. Praca magisterska zatytułowana „Wpływ wybranych parametrów syntezy na stabilność nanocząstek metali” pod kierunkiem dr inż. Dagmary Malina, została obroniona w roku 2017. Następnie, mgr inż. Agnieszka Kurek stała się uczestnikiem Środowiskowych Studiów Doktoranckich „Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej” InterDokMed.

Celem przedstawionej pracy była analiza związku właściwości mechanicznych tkanki endometrium w kontekście zmian patologicznych występujących w obrębie tkanki endometrium, jak również ich związku z płodnością. Pomiar właściwości mechanicznych tkanki endometrium zostały wykonane za pomocą mikroskopu sił atomowych pracującego w trybie spektroskopii sił. Przeprowadzone badania wykazały zależność wyznaczonych wartości modułu elastyczności od rozwoju polipów i mikropolipów w macicy.

**Politechnika
Warszawska**

ul Noakowskiego 3
00-664 Warszawa
www.ch.pw.edu.pl

Należy podkreślić, że praca dotyczy bardzo ważnego, globalnego problemu jakim są zaburzenia płodności. Badacze przewidują, że globalny współczynnik dzietności będzie stale spadał - z 2,37 w 2017 r. do 1,66 w 2100 r. To znacznie poniżej punktu zapewniającego ciągłość pokoleniową - przy czym wskaźniki spadną do około 1,20 we Włoszech i Hiszpanii i nawet do 1,17 w Polsce.

Przedstawiona rozprawa doktorska została napisana w formie klasycznej 128-stronicowej monografii w języku polskim zawierającej 6 tabel i 45 rysunków. Na podkreślenie zasługuje bogata bibliografia obejmująca 217 pozycji, z czego ok. 70% stanowią prace opublikowane w ciągu ostatnich 10 lat. Rozprawa doktorska ma standardowy układ z podziałem na następujące rozdziały: wprowadzenie, cel i zakres badań, przegląd literaturowy (rozdziały 3-6), część doświadczalna, podsumowanie i wnioski. Zaskakuje umieszczenie streszczeń na końcu pracy, ale pod względem formalnym praca spełnia warunki stawiane dysertacji na stopień doktora.

Przegląd literatury to obszerne, 62-stronicowe kompendium wiedzy na temat endometrium, wybranych metod (stosowanych i potencjalnych) analizy i diagnostyki chorób endometrium (ze szczególnym uwzględnieniem mikroskopii sił atomowych). Zdaniem recenzenta Autorka niepotrzebnie wdała się w szczegółowe opisy rutynowo stosowanych w biologii, biochemii i immunologii metod (Western blot, ELISA, cytofluorymetria, histologia, cytoimmunologia, mikroskopy optyczne) wystarczyłyby ogólne dane i cytacje. Doktorantka powinna również ograniczyć opisy innych patologii ciąży i skupić się na tych powodowanych przez przerosty endometrium. Ograniczenie tej części doktoratu znakomicie poprawiłoby zwartość i klarowność rozprawy. Poniżej przytoczone są przykłady niefortunnych lub błędnych sformułowań:

strona 20: „w mózgu” - w centralnym układzie nerwowym

strona 23: „enzymami oraz białkami” - enzymy są białkami, głównymi czynnikami są niekodujące RNA

strona 25: „enzymów białek” - jw. enzymy są białkami

strona 25: „E-kadheryny (E-cadherin, ang. epithelial cadherin) oraz mucyny-1 (MUC1, ang. mucin1)” - białek przyczepności komórkowej: E-kadheryny oraz białka tworzącego warstwę śluzu mucyny-1

strona 25: „zacieraniu” - zanikowi

strona 26: „komórek złośliwych” - komórek nowotworowych,

Rys 6.: „komórki naturalnego zabójcy macicznego” - maciczne limfocyty naturalni zabójcy

strona 49: „dwuniciowe cDNA” - jednoniciowe cDNA

strona 50: „umożliwia wykrywanie białek, w szczególności antygenów o charakterze białkowych oraz przeciwciał” - przeciwciała są białkami.

Rys 9 i 11 są zbędne

strona 56: „trofoblasty” - trofoblastu

Uważna korekta tekstu pozwoliłaby na uniknięcie tych niedociągnięć.

Natomiast rozdział dotyczący technik, które można zastosować w analizie właściwości mechanicznych endometrium został bardzo dobrze napisany, o czym świadczy również fakt, że był on podstawą pracy przeglądowej „*Methods for Studying Endometrial Pathology and the Potential of Atomic Force Microscopy in the Research of Endometrium*” opublikowanej w czasopiśmie *Cells* (IF 7,666).

Badania opisane w niniejszej rozprawie zostały wykonane na tkankach pobieranych od pacjentek Oddziału Klinicznego Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, podczas planowo przeprowadzanych zabiegów. Badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej na podstawie opinii nr. 1072.6120.180.2019 z dnia 27.06.2019 (opinia nie została załączona do pracy). Jest to bardzo trudny model badawczy. Każdy etap badań (od pobierania próbek techniką biopsji

aspiracyjnej do pomiarów właściwości mechanicznych tkanek za pomocą AFM) wymagał opracowania specjalnych protokołów. Stąd pytanie recenzenta czy była podjęta próba izolacji komórek z pobranych biopsji? Zwłaszcza, że na stronie 43 Doktorantka pisze: *„Wyjaśnienie procesów zachodzących w endometrium, a także przyczyn zaburzeń w jego fizjologii, wymaga scharakteryzowania komórek tworzących jego strukturę. W tym celu konieczne jest wyizolowanie komórek nabłonkowych i zrębu”*. Natomiast w ostatnim akapicie podsumowania pracy, na stronie 106, Doktorantka stwierdza, że: *„Wyników uzyskanych podczas pomiarów AFM nie można odnieść bezpośrednio do danych z modelowania, gdyż model dotyczy pojedynczej komórki.”* Zdaniem recenzenta przeprowadzenie pomiarów na komórkach wyizolowanych z biopsji pozwoliłoby na odniesienie się do danych z modelowania i opublikowanie tego etapu badań. Ponadto, pobrane tkanki były mrożone przed wykonaniem pomiarów za pomocą AFM. Dlaczego pobrane tkanki były zamrażane (tym bardziej, że z opisu wynika, że nie dodawano krioprotektantów) i czy były przeprowadzone pomiary na tkankach nie poddanych temu procesowi? Poza tym w eksperymentach biologicznych dąży się do uzyskania reprezentatywnej liczby przypadków w celu uzyskania statystycznej znamienności. Autorka zbadała tkanki pobrane od 17 pacjentek w tym powtórzone są tylko polipy endometrium. Recenzentowi trudno stwierdzić czy to odpowiednio liczna grupa badawcza. Wyznaczone dla każdej próbki wartości modułu Younga zostały przedstawione w postaci przykładowych histogramów (Rys. 30). Na stronie 89 Autorka napisała: *„Rozkład wyników może odpowiadać rozkładowi wartości ekstremalnej lub rozkładowi lognormalnemu.”*. Jaki test został wykorzystany do odpowiedzi na pytanie czy dane pochodzą z rozkładu normalnego czy logarytmiczno-normalnego? Czy analizowana była funkcja gęstości prawdopodobieństwa zmiennej? Piki wykresu gęstości pomagają określić, gdzie wartości są skoncentrowane w przedziale. Z kolei na stronie 90

Doktorantka napisała: „Wyznaczenie średniej dla tego rozkładu wiązałoby się z zawyżeniem jej wartości, dlatego dla otrzymanych danych nie przedstawiono danych statystycznych opartych o średnią. Z tego względu do analizy zostały użyte wartości wyznaczone dla maksimum histogramu.” W jaki sposób zostały wyznaczone te wartości?

Proszę o odniesienie się do tych uwag podczas obrony.

W końcowej części pracy (Rozdział 8. Podsumowanie i wnioski) brakuje omówienia prowadzonych badań i ich wyników w szerszym kontekście naukowym. Autorka nie podejmuje próby przedstawienia roli jaką prowadzone przez nią badania mają dla rozwoju uprawianej dyscypliny naukowej i koncentruje się wyłącznie na badanym przez nią układzie. Należy natomiast zwrócić uwagę, że dysertacja jest bardzo starannie przygotowana pod względem graficznym.

Niedosyt pozostawia również dorobek publikacyjny Doktorantki. Opublikowany został tylko jeden artykuł przeglądowy związany z tematyką rozprawy doktorskiej w czasopiśmie recenzowanym i jeden rozdział w monografii.

Podsumowując uważam jednak, że Autorka w przedstawionej rozprawie doktorskiej podjęła próbę zastosowania AFM w trybie spektroskopii sił do wykonania badań na bardzo trudnym modelu badawczym. Wydaje się, że otrzymane wyniki stanowią podstawę, aby przypuszczać, że istnieje związek wartości modułu Younga tkanki endometrium z płodnością. Jest to niewątpliwie zachęta do dalszych badań. Autorka posługuje się również doskonale współczesną literaturą naukową w uprawianej dziedzinie o czym świadczą wyczerpujące cytowania najważniejszych publikacji doświadczalnych i teoretycznych.

W związku z powyższym, pomimo wielu uwag krytycznych, stwierdzam, że przedstawiona dysertacja spełnia warunki stawiane w Ustawie Prawo

o szkolnictwie wyższym i nauce z dnia 20 lipca 2018 r. i wnoszę o dopuszczenie doktorantki do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.

