

Kraków, 7.10.2022

**Recenzja rozprawy doktorskiej pani mgr Agnieszki Kurek, zatytułowanej:**

***Mikroskopia Sił Atomowych w diagnostyce chorób macicy w oparciu o  
właściwości mechaniczne tkanki endometrium***

W ostatnich latach, prace naukowe coraz częściej zwracają uwagę na rolę właściwości mechaniczne tkanek czy komórek w ocenie stanu funkcjonowania narządu, rozwoju dysfunkcji lokalnej jak i globalnej obrazującej postęp zmian chorobowych. W zakresie tych badań mieści się przedstawiona mi do recenzji praca pani mgr Agnieszki Kurek, dotycząca badań właściwości mechanicznych tkanki endometrium.

Choroby endometrium i związana z tym niepłodność to poważny problem nie tylko natury medycznej, ale również społecznej i psychicznej. Nieprawidłowy rozrost tkanki endometrium, zmiany w obrębie jej struktury jak i powstałe zmiany nowotworowe prowadzą do utraty jej podstawowej funkcji. W niniejszej pracy postawiono tezę, iż jedną z przyczyn tego stanu, są zmiany właściwości mechanicznych endometrium, w szczególności wzrost sztywności tej tkanki uniemożliwia zagnieżdżenie zarodka, co prowadzi do poronień i bezdzietności. Jako cel przyjęto poszukiwanie korelacji między zmianą chorobową endometrium, jego sztywnością oraz płodnością pacjentki od której pobierano tkankę. Od razu zaznaczę, że zarówno teza jak i cel przyjęty w pracy jest ambitny, ale też trudny do realizacji. Praca z materiałem biopsyjnym pobieranym od pacjentek z różną historią medyczną to z założenia praca na mocno zróżnicowanej grupie badawczej. Zaprezentowane w pracy badania przeprowadzono głównie dla tkanek pobranych od pacjentek ze zdiagnozowanym polipem endometrium.

Pracę doktorską pani mgr Kurek rozpoczyna krótki rozdział zawierający wprowadzenie do tematu pracy. Następnie został nakreślony cel pracy oraz zakres problemów badawczych podejmowanych podczas wykonywania niniejszej pracy. Można je podzielić na problem metodologiczny, czyli przygotowanie materiału biopsyjnego do badań z wykorzystaniem mikroskopu AFM; problem doświadczalny - pomiar właściwości mechanicznych tkanki; problem analizy danych - dobór odpowiedniego modelu analitycznego do opisu właściwości elastycznych tkanki. Przyjęta konwencja pracy doktorskiej jest prawidłowa, czytelnik od razu wie czego może spodziewać się w dalszej części pracy.

W rozdziale 3 pani mgr Kurek precyzyjnie opisuje zagadnienia medyczne związane z budową i funkcją tkanki endometrium, jak i przybliża zmiany patologiczne najczęściej rozwijające się w obrębie tej tkanki. Następnie w rozdziale 4 wymienione są metody, biochemiczne, chemiczne i fizyczne wykorzystywane w badaniu i diagnostyce chorób endometrium, z wyszczególnieniem ich podstaw fizycznych jak i celowości stosowania. Kolejne podrozdziały od 4.1 do 4.5 zawierają opisy tych metod. Ciężko mi się odnieść do tej części pracy, dlatego że w części eksperymentalnej żadna z wymienionych metod nie została wykorzystana, czyli jest to raczej część związana z przeglądem możliwości badawczych w analizie dysfunkcji endometrium.

W rozdziale 5 przedstawiony został opis głównej metody badawczej tej rozprawy doktorskiej, czyli mikroskopu sił atomowych (AFM). Rozdział rozpoczyna się standardowo, od przybliżenia budowy mikroskopu AFM, zasady działania z wyszczególnieniem trybów pracy stosowanych w metodach obrazowania powierzchni. Opis jest zwięzły, w części eksperymentalnie nie ma obrazów badanych powierzchni, więc ta część ma na celu wprowadzenie czytelnika do tematu pomiarów AFM. Najwięcej uwagi, w rozdziale 5, poświęcono pomiarowi właściwości mechanicznych komórek z wykorzystaniem mikroskopu AFM, czyli scharakteryzowaniu kolejnych etapów tworzenia krzywych siła-odległość, modelom teoretycznym służącym do analizy danych, jak również powiązaniu budowy komórki z jej elastycznością. Opis jest wyczerpujący, Autorka wskazuje, iż przyjęte, fizyczne modele wykorzystywane do opisu elastyczności komórki nie są doskonałe, dają raczej przybliżone wartości dla tak przestrzenie heterogennych struktur jak komórki. Jednocześnie podkreśla ważny aspekt pomiarów mechanicznych w ocenie zmian patologicznych komórek, przytaczając przykład zmian sztywności komórki w procesie nowotworzenia. W rozdziale 6 został przedyskutowany problem poszukiwania najbardziej odpowiedniego modelu opisującego odkształcenie komórki pod wpływem przyłożonej siły zewnętrznej z uwzględnieniem odpowiedzi elastycznej oraz lepkosprężystej komórki.

W 7 rozdziale dochodzimy do części eksperymentalnej pracy. Na początku czytamy o miejscu pobrania badanych tkanek, grupach badawczych, oraz sposobie przygotowania próbek do badania. Po lekturze rozdziału 7.1 nasuwają się pytania, które pozwolą doprecyzować metodologię przygotowania próbek. Po pierwsze prosiłabym o odniesienie się do następujących pytań. Czy pobieranie materiału metodą biopsji aspiracyjnej może naruszać jej strukturę, a tym samym wpływać na pomiar elastyczności? Jak przedstawiono w pracy, próbka była mrożona po pobraniu, wobec tego czy próbki mrożone były w buforze HBSS, czy używano związków krioprotekcyjnych? Czy bezpośrednio po pobraniu, wycinki były utrwalane? W dalszym etapie próbkę przytwierdzano do szalki Petriego przy pomocy kleju cyjanoakrylowego. Skąd taki wybór kleju? Jakie wymiary miały wycinki przytwierdzone do szalki za pomocą tego kleju?

W rozdziale 7.2 opisano metodologię przeprowadzonych pomiarów AFM. Dużym plusem tej pracy jest zastosowanie w pomiarach dwóch rodzajów próbników: piramidalnego i kulistego. W

przypadku próbników kulistych, samodzielnie przyklejano kulkę do dźwigni AFM oraz wykonywano kalibrację, co z pewnością wymagało dużej precyzji i determinacji. Jednocześnie jako osoba na co dzień mająca kontakt z tego typu pomiarami, chciałabym dopytać o kwestie pomiaru, nie do końca wyjaśnione w tym rozdziale:

- str. 85, cyt. „*Pomiary prowadzono z różnymi prędkościami skanowania, wynoszącymi 0.5; 1; 1,8 oraz 2  $\mu\text{m/s}$ .*” Proszę o doprecyzowanie, skąd taki rozrzut wartości? Czy szybkość ruchu próbника była dobierana do rodzaju próbника? Czy porównywane przez Panią wyniki zostały uzyskane dla tego samego parametru loading rate?

- dalej na stronie 85 czytamy: „*Siłę nacisku z jaką ostrze pomiarowe dojeżdża do powierzchni próbki ustawiono poprzez parametr setpoint, na poziomie 0,1-0,5.*” Proszę o doprecyzowanie, co oznacza parametr setpoint, uzupełnić jednostkę. W dalszej części pracy na Rysunku 29 pokazała Pani krzywa eksperymentalną, gdzie maksymalna siła indentacji wynosi 90nN. Jak to się ma do wskazanej wartości setpoint.

- odnosząc się do Rysunku 26 oraz opisu przeprowadzonej analizy zamieszczonej na stronie 86, cyt. „*W matematycznej interpretacji wyników wykorzystano, wyznaczony dla każdej krzywej zarejestrowanej podczas dojeżdżania do powierzchni, punkt kontaktu, ustawiony w punkcie przegięcia krzywej, a także punkt przejścia odpowiadający głębokości indentacji, wyznaczany w miejscu usztywnienia próbki*”. Proszę o wyjaśnienie, w jaki sposób wyznaczała Pani zarówno punkt kontaktu oraz definiowany przez Panią „punkt przejścia”? Czy wybór był arbitralny, czy stosowała Pani podejście analityczne?

Do wyznaczenia modułu Younga z przeprowadzonych pomiarów zostały zastosowane dwa modele, dobrane prawidłowo w zależności od geometrii stosowanego próbника. Niestety nigdzie w pracy nie pokazano dopasowania tych modeli do krzywych indentacji uzyskanych w eksperymencie. Taki obrazek zdecydowanie wzmocniłby pracę i wybór modelu.

W rozdziale 7.3 przedstawiono wyniki analizy danych pomiarowych zebranych dla wycinków tkanek endometrium. W sumie, w pracy przebadano materiał od 17 pacjentek, największą grupę stanowiły pacjentki ze stwierdzonym polipem endometrium. Dla każdej próbki przeprowadzono pomiar zarówno ostrzem piramidalnym jak i próbnikiem w kształcie kuli. Otrzymane wyniki przedstawiono w postaci histogramów. Niestety ten rozdział budzi najwięcej pytań i uwag, które wymagają wyjaśnień.

Ilościowa analiza danych z pomiarów AFM najczęściej opiera się na dopasowaniu krzywej rozkładu normalnego lub logarytmiczno-normalnego i na tej podstawie wyznacza się medianę i wartość średnią. W przedstawionej pracy doktorskiej, nie wykonano dopasowania wspomnianych krzywych rozkładu ani nie wyznaczono wartości średnich, uzasadniając, iż wykonanie tej operacji „sztucznie” zwiększa wartość modułu Younga, ponieważ cyt. „*Wraz ze wzrostem liczby danych wartości średniej*

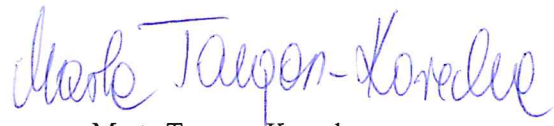
*przesuwa się w kierunku wyższych wartości*". Zamiast tego wyznaczono tzw. wartość maksimum histogramu. Nasuwa się zatem pytanie, na jakiej podstawie wyznaczono te wartości?

Na Rysunku 31 przedstawiono porównanie wartości maksymalnych otrzymanych z histogramów dla pomiarów próbnikiem piramidalnym (ostrym) oraz kulistym. Dla większości próbek zaobserwowano znaczącą różnicę między wynikami otrzymanymi dla próbnika kulistego i próbnika ostrego. Dlatego w dalszej części pracy Doktorantka skupia się na stosunku wartości modułu Younga wyznaczonego dla próbnika piramidalnego i wartości modułu Younga otrzymanego dla próbnika kulistego. Jak czytamy w pracy, cyt.: „*Wartości wyznaczone przy użyciu kulki stanowią w tym przypadku tło, natomiast uzyskane ostrzem i odniesione do globalnego modułu Younga wyniki pozwalają na zróżnicowanie próbek pod względem właściwości mechanicznych.*” W ten sposób dokonano swoistej normalizacji otrzymanych wartości w celu uwidocznienia trendu w obrębie danej grupy badawczej. Jak sama Doktorantka słusznie zauważa zastosowanie do tego typu próbek „ostrego” próbnika zwiększa rozrzut danych wynikający ze zróżnicowania przestrzennego tkanki (zarówno pod względem topografii jak i sztywności). W przypadku zaprezentowanych danych różnica wartości modułu Younga w obrębie jednej grupy badawczej wynosi od 50 do 250kPa. Jest to bardzo duża różnica, czy aby na pewno można ją wytłumaczyć różnicą w strukturze tkanki? Czy rozważała Pani wpływ podłoża i kleju mocującego tkankę na końcowy wynik pomiaru? Ciężko to określić bezpośrednio z wyników nie mając wcześniej informacji o grubości mierzonej tkanki, jak i jej strukturze (np. na podstawie zdjęć mikroskopowych). Czy do analizy zostały wykorzystane wartości modułu Younga uzyskane dla tych samych parametrów pomiaru (loading rate, maksymalnej indentacji itp.)? Biorąc pod uwagę prezentację otrzymanych wyników, nie rozumiem dlaczego wartość stosunku modułu Younga dla próbnika ostrego i kulistego jest podawany z dokładnością do 5 miejsc po przecinku, bez podania analizy niepewności.

Podsumowując, w niniejszej pracy poszukiwano związku między właściwościami mechanicznymi endometrium z patologicznymi zmianami tej tkanki jakimi są polipy. Mimo iż, przeprowadzone w pracy pomiary nie udowodniły związku między rodzajem zmian patologicznych a zmianą sztywności tkanki, poprzez zaproponowaną metodę prezentacji danych wskazano pewien trend zmian w obrębie grup badawczych. Chciałabym pokreślić, iż pracę wykonano na trudnym materiale badawczym, bez materiału referencyjnego, stąd mogą wynikać problemy w interpretacji wyników i problem z postawieniem silniejszych wniosków. Technika AFM wbrew pozorom nie jest łatwą techniką w stosowaniu do pomiarów próbek biologicznych, szczególnie tak skomplikowanych strukturalnie jak wycinki tkanek. Należy podkreślić, że próbki pobrane podczas biopsji, chociaż medycznie dotyczą tej samej zmiany, praktycznie nigdy nie są takie same, co widać na zaprezentowanych danych. Wymieniając pozytywne aspekty tej pracy z pewnością należy podkreślić jej interdyscyplinarność, zaprezentowane dane jak i obliczenia wymagały od Doktorantki wiedzy z zarówno z zakresu medycyny, fizyki jak i metod obliczeniowych. W pracy przedstawiono fachowy przegląd metod badawczych, które

mają duży potencjał w diagnostyce chorób endometrium, jak zaprezentowano doniesienia literaturowe bezpośrednio związane z tematem badań. Wszystko to podkreśla wiedzę i dobre przygotowanie Doktorantki. Wskazane w recenzji moje uwagi krytyczne, jak już wspomniałam, miały na celu doprecyzowanie zagadnień związanych z metodologią pomiaru jak i analizą danych pomiarowych. Wyrażając ogólną opinię, pominięcie w pracy wskazanych powyżej informacji, wprowadzone uogólnienia bez podparcia analitycznego, niepotrzebnie umniejszają pracy, która podejmuje ambitny temat. Założone na wstępie cele jak i zadania badawcze zostały zrealizowane.

Przedstawiona mi do recenzji praca doktorska stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego oraz potwierdza ogólną wiedzę Kandydatki do stopnia doktora w dyscyplinie nauki fizyczne. Stwierdzam, że rozprawa spełnia wszystkie zwyczajowe i formalne wymogi stawiane rozprawom doktorskim w ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce i wnioskuję do Rady Dyscypliny o dopuszczenie pani mgr Agnieszki Kurek do publicznej obrony pracy doktorskiej oraz dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Marta Targosz-Korecka

