



AKADEMIA GÓRNICZO-HUTNICZA IM. STANISŁAWA STASZICA W KRAKOWIE

DZIEDZINA NAUK ŚCISŁYCH I PRZYRODNICZYCH
DYSCYPLINA NAUKI FIZYCZNE

ROZPRAWA DOKTORSKA

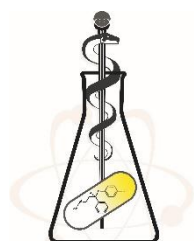
Mikroskopia Sił Atomowych
w diagnostyce chorób macicy w oparciu
o właściwości mechaniczne tkanki endometrium

Autor: Agnieszka Kurek

Promotorzy rozprawy: dr hab. inż. Jakub Barbasz (IKiFP PAN)
prof. dr hab. med. Robert Jach (CM UJ)

Praca wykonana: Instytut Katalizy i Fizykochemii Powierzchni
im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk (IKiFP PAN)
Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego (CM UJ)

Kraków, 2022



InterDokMed

Rozprawa doktorska powstała w trakcie realizacji
Środowiskowych Studiów Doktoranckich
w ramach Projektu nr POWR.03.02.00-00-I013/16,
"Interdyscyplinarność dla medycyny innowacyjnej" InterDokMed,
realizowanych w ramach Programu Operacyjnego Wiedza Edukacja Rozwój 2014-
2020, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego



Unia Europejska
Europejski Fundusz Społeczny



Serdeczne podziękowania składam promotorom, panu dr hab. inż. Jakubowi Barbaszowi oraz panu prof. dr hab. med. Robertowi Jachowi, za opiekę naukową, cenne wskazówki i uwagi oraz możliwość rozwoju naukowego i osobistego.

Podziękowania kieruję również do osób, bez których opisywane w niniejszej rozprawie badania nie mogłyby zostać zrealizowane.

Dr Kamili Sofińskiej dziękuję za wprowadzenie w tematykę mikroskopii sił atomowych.

Lek. Med. Esterze Kłosowicz oraz lek. Med. Andrzejowi Zmaczyńskiemu pragnę podziękować za istotne rady oraz owocną współpracę w zakresie pobierania materiału do badań.

Dr. Leszkowi Krzemieniowi dziękuję za przybliżenie zagadnień modelowania komputerowego.

Dziękuję mgr Magdalenie Giergiel za wprowadzenie w tematykę hodowli komórkowych oraz pomiarów AFM żywych komórek.

Dziękuję także lek. Łukaszowi Chmurze za przekazaną wiedzę o izolacji komórek z tkanki.

Szczególne podziękowania składam rodzinie, zwłaszcza mężowi, rodzicom i teściom, za wsparcie, wyrozumiałość i umożliwienie pracy naukowej.

Pracę dedykuję córce Klarze:

aby zawsze dążyła do realizacji swoich marzeń i celów.

Spis treści

Spis rysunków.....	5
Spis tabel.....	8
Wykaz akronimów.....	9
Wykaz stosowanych oznaczeń.....	12
1. Wprowadzenie w tematykę pracy.....	15
2. Cel i zakres badań.....	17
3. Endometrium.....	18
3.1. Budowa endometrium.....	18
3.2. Cykl miesięczkowy a właściwości morfologiczne tkanki endometrium.....	19
3.3. Implantacja.....	26
3.4. Choroby i zmiany patologiczne w obrębie endometrium.....	27
3.4.1. Niepłodność.....	27
3.4.2. Endometrioza.....	31
3.4.3. Nowotwory endometrium.....	33
4. Wybrane metody badań w analizie i diagnostyce chorób endometrium.....	35
4.1. Obrazowanie.....	39
4.2. Analiza ekspresji genów i białek.....	46
4.3. Analiza składu chemicznego.....	53
4.4. Analiza oddziaływań międzykomórkowych i komórka-podłoże.....	56
4.5. Techniki o potencjalnym zastosowaniu w badaniach nad endometrium.....	56
5. Mikroskopia sił atomowych AFM.....	63
5.1. Budowa i zasada pomiaru.....	64
5.2. Spektroskopia sił.....	71
5.3. Mikroskop sił atomowych w analizie elastyczności komórek i tkanek.....	73
6. Modelowanie komputerowe komórek.....	77
6.1. Modele matematyczne komórek.....	77

6.2. Metoda elementów skończonych	81
7. Część doświadczalna.....	83
7.1. Materiały badawczy	83
7.2. Metody badań.....	84
7.3. Wyniki badań i dyskusja	88
7.3.1. Spektroskopia sił tkanki	88
7.3.2. Model komórki.....	98
8. Podsumowanie i wnioski.....	105
9. Literatura	107
Streszczenie	127
Abstract	128

Spis rysunków

Rysunek 1. Budowa endometrium.....	18
Rysunek 2. Schemat jajnikowego cyklu miesięczkowego.	20
Rysunek 3. Wzory strukturalne estrogenów, progesteronu oraz prostaglandyny PGF2 α 21	
Rysunek 4. Zmiany ekspresji hormonów oraz towarzyszące im przemiany w obrębie endometrium w czasie cyklu miesięczkowego.	22
Rysunek 5. Modyfikacje histonów oraz metylacja DNA.	24
Rysunek 6. Schemat przebiegu procesu implantacji oraz towarzyszącej mu decidualizacji komórek endometrium.	27
Rysunek 7. Zasada pobierania wycinka techniką biopsji aspiracyjnej.	41
Rysunek 8. Zmiany w ekspresji wimentyny, E-kadheryny oraz cytokeratyny w wyniku decidualizacji, zobrazowane przy pomocy mikroskopii konfokalnej.....	45
Rysunek 9. Wzory strukturalne nitrocelulozy oraz polifluorku winylidenu.	48
Rysunek 10. Schemat ideowy techniki PCR.	48
Rysunek 11. Wzory strukturalne kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego oraz 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyny.....	51
Rysunek 12. Diagram Jabłońskiego.....	54
Rysunek 13. Sekwencja fotografii typowych dla eksperymentu z użyciem mikropipety.....	58
Rysunek 14. Zastosowanie techniki TERS do analizy składu chemicznego biomembrany.	61
Rysunek 15. Budowa mikroskopu sił atomowych.....	63
Rysunek 16. Najczęstsze kształty dźwigni i próbników.....	64
Rysunek 17. Ograniczenia pomiaru wynikające z geometrii ostrza.	66
Rysunek 18. Oddziaływania ostrze-powierzchnia.....	68
Rysunek 19. Tryby pracy AFM.	69
Rysunek 20 Ugięcia dźwigni podczas pomiaru AFM.	71

Rysunek 21. Krzywe siłowe przedstawiająca zależność wychylenia dźwigni od odległości ostrza od powierzchni próbki.	72
Rysunek 22. Przykładowe mapy elastyczności komórek.	72
Rysunek 23. Struktura wnętrza komórki zobrazowana przy użyciu mikroskopu konfokalnego.	74
Rysunek 24. Wartości modułu Younga wybranych komórek zdrowych i nowotworowych, w oparciu o dane literaturowe.	75
Rysunek 25. Wartości modułu Younga wybranych tkanek zdrowych i nowotworowych, w oparciu o dane literaturowe.	76
Rysunek 26. Rysunek. Schematyczna budowa komórki w wybranych modelach.	78
Rysunek 27. Rysunek Dyskretyzacja obszaru modelowanej komórki.	82
Rysunek 28. Procedura przyklejania kulki do dźwigni próbnika.	86
Rysunek 29. Przykład opracowania krzywej siłowej.	88
Rysunek 30. Przykładowy histogram przedstawiający uzyskane wyniki.	89
Rysunek 31. Wartości modułu Younga wyznaczone przy pomocy ostrza i kulki dla poszczególnych próbek.	90
Rysunek 32. Schemat pomiaru kulką oraz ostrzem o kształcie piramidy.	91
Rysunek 33. Histogramy obrazujące niejednorodność analizowanych tkanek u pacjentek z polipowato uformowaną błoną, polipami i mikropolipami.	92
Rysunek 34. Stosunek ostrze/kulka wartości modułu Younga dla grupy pacjentek z niepolipowatymi zmianami, pacjentek z polipami oraz pacjentek z mikropolipami. ...	95
Rysunek 35 Rysunek. Średni stosunek ostrze/kulka wraz z minimalnym i maksymalnym wynikiem uzyskanym dla poszczególnych grup.	96
Rysunek 36. Stosunek ostrze/ kulka w zależności od płodności pacjentek.	97
Rysunek 37. Geometria komórki w symulacji.	98
Rysunek 38. Zależność wartości wykładnika n indentacji od grubości korteksu oraz promienia próbniaka.	100
Rysunek 39. Wpływ zmiany rozmiaru próbniaka na zależność wartości parametru swobodnego A od grubości korteksu.	100

Rysunek 40. Wpływ zmiany grubości korteksu na zależność wartości parametru swobodnego A od promienia próbnika.....	101
Rysunek 41. Wpływ zmiany rozmiaru komórki na zależność wartości siły odpowiedzi od głębokości indentacji.	101
Rysunek 42. Zależność siły odpowiedzi na głębokość indentacji dla korteksu będącego obiektem pseudo dwuwymiarowym i trójwymiarowym.	102
Rysunek 43. Wartość współczynnika dopasowania R2 w zależności od wartości modułu Younga cytoplazmy i korteksu.	103
Rysunek 44. Wartość parametru E* w zależności od wartości modułu Younga korteksu oraz cytoplazmy.	103
Rysunek 45. Wartość parametru p w zależności od wartości modułu Younga korteksu oraz cytoplazmy.	104

Spis tabel

Tabela 1. Wybrane metody analizy i diagnostyki endometrium wraz z przykładami zastosowania w badaniach nad endometrium.	35
Tabela 2. Wybrane metody analizy komórek wraz z przykładami zastosowania.	57
Tabela 3. Właściwości lepkosprężyste komórek nabłonkowych mysiego jajnika w różnych stadiach rozwoju nowotworu.....	76
Tabela 4. Charakterystyka pacjentek włączonych do badania.	84
Tabela 5. Charakterystyka stosowanych próbników.	85
Tabela 6. Charakterystyka elementów modelowej komórki.	99

Wykaz akronimów

- ABTS- kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)
- ACTH- ang. *adrenocorticotropic hormone* - adrenokortykotropina
- AFM- ang. *atomic force microscopy*- mikroskopia sił atomowych
- ART- ang. *assisted reproductive technics*- techniki rozrodu wspomaganego
- ATP- adenzyno-5'-trifosforanu
- BIM- ang. *body mass index*- wskaźnik masy ciała
- cDNA- ang. *complementary DNA*- komplementarny DNA
- CLSM- ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*- skanująca laserowa mikroskopia konfokalna
- DNA- ang. *deoxyribonucleic acid*- kwas deoksyrybonukleinowy
- DNMT- ang. *DNA methyltransferase*- metylotransferazy DNA
- E-cadherin- ang. *epithelial cadherin*- E-kadheryna
- EGFR- ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*- receptor naskórkowego czynnika wzrostu
- ELISA- ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*- test immunoenzymatyczny
- ERK1/2- ang. *extracellular signaling-regulated kinase*- kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym
- FEM- ang. *finite element method*- metoda elementów skończonych
- FSH- folitropina
- FTIR- ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*- spektrofotometrii w podczerwieni z transformacją fourierowską
- GH- ang. growth hormon- hormon wzrostu
- GTP- guanozyno-5'-trójfosforan
- HATs- ang. *Histone acetyltransferases*- cetylotransferazy histonowe
- HBSS- ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*- zrównoważony roztwór soli Hanka
- HDACs- ang. *Histone deacetylases*- deacetylazy histonowe
- HDL- ang. *High Density Lipoprotein*- alfa-lipoproteina o dużej gęstości
- HOXA10- ang. *Homeobox A10*- białka homeotyczne Hox-A10

IGFBP-1- ang. *insulin-like growth factor binding protein 1*- insulinopodobny czynnik wzrostu 1

IL-8- Interleukina 8

IR- ang. *infrared*- podczerwień

LBC- ang. *Liquid Based Cytology*- cytologia na podłożu płynnym

LIF- ang. *leukemia inhibitory factor*- czynnik hamujący białaczkę

LH- lutropina

IVF- ang. *in vitro fertilisation*- zapłodnienie pozaustrojowe, zapłodnienie *in vitro*

MET- ang. *Mesenchymal to Epithelial Transition*- przejście mezenchymalno-epitelialne

MMPs- ang. *matrix metalloproteinases*- metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej

MOS- ang. *median overall survival*- mediana przeżycia

MPA- ang. *micropipette aspiration*- zasysanie mikropipetą

MUC1- ang. *mucin1*- mucyna-1

near IR- ang. *near infrared*- bliska podczerwień

OT, ang. *optical tweezers*- szczypce optyczne

PCA- ang. *Principal Component Analysis*- analiza składowych głównych

PCOS- ang. *Polycystic ovary syndrome*- zespół policystycznych jajników

PCR- ang. *Polymerase chain reaction*- reakcja łańcuchowa polimerazy

PGF_{2α}- prostagladyna forma F_{2α}

POF- ang. *premature ovarian failure*- przedwczesne wygasanie czynności jajnika

PRL- prolaktyna

PVDF- ang. *polyvinylidene fluoride*- polifluorek winylidenu

qPCR- ang. *quantitative polymerase chain reaction*- ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy

Real-time PCR- ang. *Real-time quantitative polymerase chain reaction*- reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym

RIF- ang. *repeated implantation failure*- powtarzające się niepowodzenia implantacji

RNA- ang. *ribonucleic acid*- kwasy rybonukleinowe

RT-PCR- ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*- Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją

SDCM- ang. *Spinning Disk Confocal Microscopy*- mikroskopia konfokalna z wirującym dyskiem

SEM- ang. *scanning electron microscope*- Skaningowa mikroskopia elektronowa

SEM*- ang. *Subcellular Element Model*- model elementu subkomórkowego

SERS- ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*- powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana

SPM- ang. *Scanning Probe Microscopy*- mikroskop z sondą skanującą

STM- ang. *scanning tunneling microscope*- skaningowy mikroskop tunelowy

TEM- ang. *transmission electron microscope*- transmisyjna mikroskopia elektronowa

TERS- ang. *Tip-enhanced Raman spectroscopy*- Spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej

TIMPs- ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*- tkankowe inhibitory metaloproteinaz

TSA- ang. *Trichostatin A*- Trichostatyna A

TSH- ang. *thyroid-stimulating hormon*- tyreotropina

USG- ang. *ultrasonography*- ultrasonografia

UV- ang. *ultraviolet*- nadfiolet

VEGF- ang. *vascular endothelial growth factor*- czynnik wzrostu śródbłonna naczyń

VLA-4- ang. *Very Late Antigen*- antygen bardzo późny

WHO- ang. *World Health Organization*- Światowa Organizacja Zdrowia

WT1- ang. *Wilms tumor 1*- guz Wiliamsa

Wykaz stosowanych oznaczeń
(zgodnie z kolejności występowania w tekście)

λ - długość fali

S- stan energetyczny

S₀- stan podstawowy

S₁- stan wzbudzony

ν_{vib} - częstotliwość wibracji

h- Stała Planca

h ν - energia

h ν_0 - początkowa lasera

h ν_{vib} - wibracyjna

$\Delta\nu$ - przesunięcie Ramana

W, W*- szerokości zagłębień w powierzchni

L, L*- odpowiadające szerokościom W i W* głębokości wsunięcia próbnika do zagłębienia

k- stała siłowa

E- moduł Younga/ moduł elastyczności

E_o- mierzony przy pomocy ostrza

E_k- mierzony przy pomocy kulki

E_{korteks}- wartość dla korteksu

E_{cyto}- wartość dla cytoplazmy

σ - przyłożone naprężenie

F- siła zewnętrzna

A- pole przekroju

ε - odkształcenie liniowe

l- długość materiału

dl- zmiana długości materiału

μ - lepkość

F- siła przyłożona podczas indentacji

e₁, e₂ - stałe elastyczności,

δ - głębokość indentacji

R- promień

$R_{\text{próbnika}}$ - dla próbника sferycznego

$R_{\text{komórki}}$ - dla komórki o kształcie semisfery

α - kąt połówkowy stożka

τ_{ij} - chwilowe naprężenie przyłożone w danym punkcie obiektu,

$\bar{\tau}_{ij}$ - średnia wartość naprężenia w danym punkcie

η - stała lepkościowa

γ_{ij} - chwilowe napięcie w danym punkcie obiektu

$\bar{\gamma}_{ij}$ - średnia wartość napięcia w danym punkcie

σ - tensor naprężeń Cauchy'ego istotny w kontekście wyznaczenia wektora naprężenia

Φ - objętość frakcji odpowiednio stałej (s) lub ciekłej (f)

Φ_s - materiał stały

Φ_f - materiał ciekły

ρ - ciśnienie płynu

I- tensor identyczności (tożsamości)

M, Λ - stałe Lamego dla materiału izotropowego, odpowiednio stałego (s) i ciekłego (f)

ϵ - nieskończenie mały tensor odkształcenia Cauch'ego

σ_{PK} - drugie naprężenie Piola-Kirchoffa w konfiguracji odniesienia

∇r - gradient przemieszczenia

ν - współczynnikiem Poissona

a - promień kontaktu podczas indentacji

θ - kąt połówkowy piramidy

s - wartość stosunku ostrze/ kulka

\bar{s} - średnia wartość stosunku ostrze/ kulka dla danej grupy

\bar{s}_i - grupa pacjentek ze zmianami niepolipowatymi

\bar{s}_p - grupa pacjentek z polipami

\bar{s}_m - grupa pacjentek z mikropolipami

$\bar{s}_{\text{płodne}}$ - grupa pacjentek płodnych

\bar{S} poronienia- grupa pacjentek po poronieniach

S pierwotna- pacjentka z niepłodnością pierwotną

\bar{S} wtórna- grupa pacjentek z niepłodnością wtórną

t_{korteks} - grubość korteksu

n - wykładnik głębokości indentacji

A - parametr swobodny

E^* - parametr niezależny od geometrii

p - parametr niezależny od geometrii,

R^2 - wartość dopasowania

1. Wprowadzenie w tematykę pracy

Według danych Światowej Organizacji Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) z roku 2020, z powodu niepłodności cierpi 50-80 milionów osób na świecie [1]. Zaburzenia płodności dotyczą zarówno kobiet [2] jak mężczyzn [1] i stanowią problemem globalny [3]. Wśród przyczyn niepłodności wyróżnić można czynniki związane z nieprawidłową budową i funkcjonowaniem układu rozrodczego [2,4-5], jak również czynniki psychologiczne [6-7] oraz związane ze stylem życia [8]. Niepłodność jest zagadnieniem zarówno medycznym jak i społecznym [9], stanowiąc nie tylko przyczynę zaburzeń reprodukcji, ale też prowadząc do stresu [10-11], cierpienia psychicznego [12] oraz depresji [11], zwłaszcza wśród kobiet [10]. Pomimo opisanego szeregu czynników stanowiących przyczyny zarówno żeńskiej jak i męskiej niepłodności, szacuje się, że przyczyny 20-30% przypadków pozostają nieznane i klasyfikuje się je jako niepłodność niewyjaśnioną, o niewyjaśnionej etiologii, zwaną również idiopatyczną [13-15]. Sposób leczenia niepłodności jest bezpośrednio związany ze zdiagnozowanymi chorobami utrudniającymi lub uniemożliwiającymi zapłodnienie i ma na celu w pierwszej kolejności usunięcie przyczyny niemożności zajścia w ciążę [14]. Właściwa diagnoza jest kluczowym elementem warunkującym powodzenie leczenia niepłodności.

Zmiany patologiczne w obrębie macicy, takie jak polipy, mięśniaki czy zrosty, stanowią ważną przyczynę niepłodności diagnozowaną u 10-15% pacjentek leczonych z powodu zaburzeń płodności [13]. Zgodnie z doniesieniami literaturowymi niszowe w bliźnie po cesarskim cięciu mogą prowadzić do wystąpienia niepłodności wtórnej, choć zależność ta nie została dostatecznie wyjaśniona [16]. Wśród chorób stanowiących czynniki etiologiczne niepłodności należy wskazać także endometriozę, definiowaną jako obecność endometrium poza jamą macicy i występującą u ponad jednej trzeciej populacji kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością [17].

Właściwości morfologiczne endometrium zmieniają się w czasie cyklu miesięczkowego [18-19] oraz w wyniku zapłodnienia [20]. Właściwości endometrium na poziomie ultrastrukturalnym, takie jak obecność struktur zwanych pinopodami, stanowią jeden z czynników warunkujących zapłodnienie [21]. Procesowi implantacji zarodka w endometrium towarzyszą również zmiany takich właściwości biofizycznych jak szorstkość oraz adhezja, ale również zmiany w sztywności tkanki [20]. Właściwości mechaniczne, w szczególności elastyczność, zarówno pojedynczych komórek jak

i tkanek stanowią ważny aspekt ich prawidłowego funkcjonowania w organizmie. Zmiany sztywności mogą towarzyszyć rozwojowi wielu chorób, zwłaszcza nowotworowych [22-28]. Technika umożliwiającą analizowanie topografii oraz mechaniki struktur biologicznych z nanometryczną dokładnością jest mikroskopia sił atomowych (AFM, ang. *atomic force microscopy*) [29]. Pomimo licznych przesłanek świadczących o istotności właściwości mechanicznych, brak jest doniesień literaturowych na temat badań mających na celu powiązanie elastyczności tkanki endometrium z płodnością oraz rozwojem zmian patologicznych w obrębie macicy.

2. Cel i zakres badań

Celem badań zrealizowanych w ramach studiów doktoranckich i opisanych w niniejszej rozprawie doktorskiej była analiza związku właściwości mechanicznych endometrium, w szczególności wartości modułu Younga tkanki endometrium, z płodnością oraz obecnością łagodnych zmian patologicznych w obrębie macicy.

Przeprowadzone badania obejmowały:

a) opracowanie protokołu zabezpieczenia, przygotowania do badania oraz analizowania fragmentów tkanki endometrium, pobieranych techniką biopsji aspiracyjnej.

b) pomiary właściwości mechanicznych przeprowadzone z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych (AFM, ang. *atomic force microscope*).

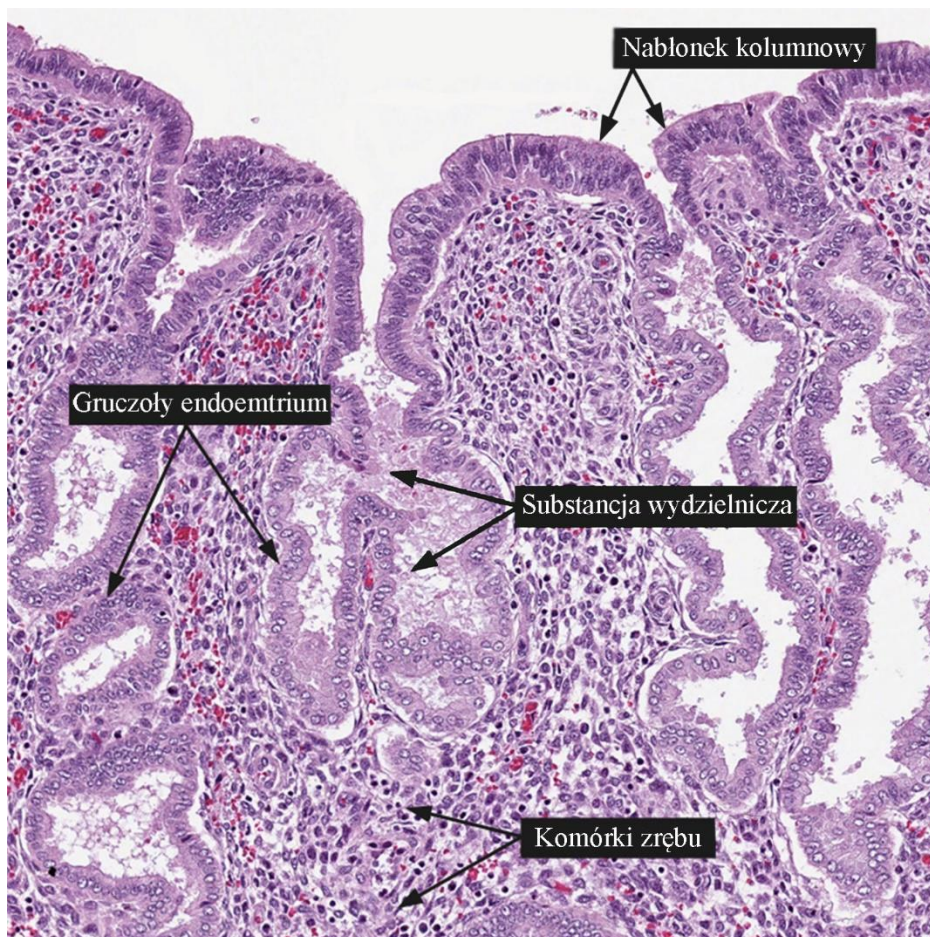
c) opracowanie modeli obliczeniowych pojedynczej komórki, prostych obliczeniowo i równocześnie w jak najlepszym stopniu odzwierciedlających odpowiedź materiału na naprężenie zewnętrzne wywołane podczas procesu indentacji.

3. Endometrium

3.1. Budowa endometrium

Macica jest narządem pełniącym kluczową rolę w procesie implantacji zarodka i jego rozwoju[4]. Ściana macicy zbudowana jest z trzech warstw:

- a) błony surowiczej określanej jako warstwa otrzewnowa i stanowiącej zewnętrzną warstwę narządu [15],
- b) mięśniowej (myometrium) zapewniającej zdolność do aktywności skurczowej macicy [30],
- c) błony śluzowej zwanej endometrium, będącej warstwą wyściełającą jamę macicy [31].



Rysunek 1. Budowa endometrium. Na podstawie: [32].

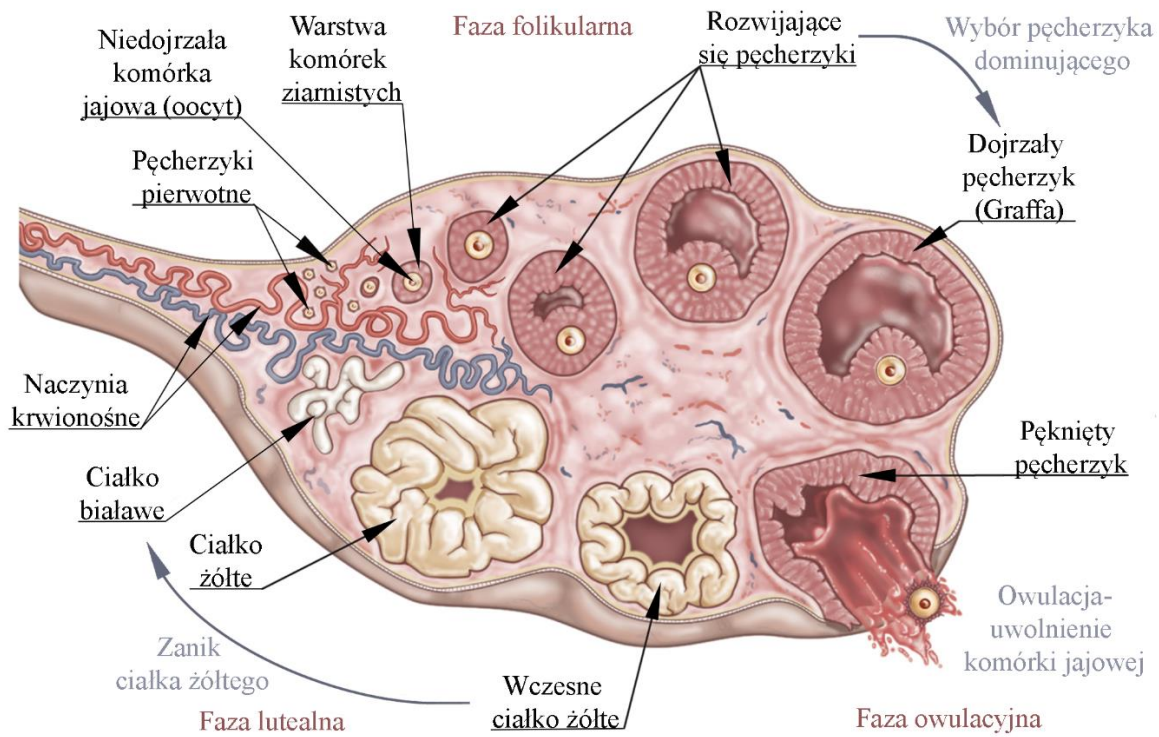
Endometrium jest zbudowane z komórek nabłonkowych oraz komórek zrębu, zorganizowanych w dwie warstwy oddzielone błoną [31] (Rys. 1.). Strukturę endometrium tworzą ponadto gruczolę [33] oraz naczynia krwionośne [34]. Komórki

zrębu, w przeciwieństwie do komórek nabłonkowych, posiadają bezpośredni kontakt z naczyniami krwionośnymi, który umożliwia aktywowanie komórek zrębu poprzez molekuly cyrkulujące we krwi, takie jak cząsteczki sygnałowe, hormony czy też cytokiny. Błona występująca między nabłonkiem a zrębem umożliwia cząsteczkom sygnałowym oddziaływanie na komórki nabłonkowe. Tym samym komórki zrębu posiadają znaczący wpływ na wzrost i apoptozę komórek nabłonkowych [31]. Z uwagi na funkcjonowanie endometrium wyróżnia się warstwę podstawową, zbudowaną z cew gruczołowych, bogatokomórkowego podścieliska oraz włókien tkanki łącznej siateczkowej, pełniącą funkcję regeneracyjną endometrium po złuszczeniu podczas miesiączki oraz warstwę czynnościową, która złuszcza się w końcowej fazie cyklu miesiączkowego, a której zadaniem jest przygotowanie się do przyjęcia zarodka [15].

3.2. Cykl miesięczkowy a właściwości morfologiczne tkanki endometrium

W czasie cyklu miesięczkowego endometrium podlega szeregowi morfologicznych i funkcjonalnych przemian, kontrolowanych przez hormony i wiążących się ze zmianami w ekspresji genów [19]. Zmiany zachodzące w endometrium są charakterystyczne dla poszczególnych faz cyklu i odgrywają kluczową rolę w procesie zagnieżdżenia zarodka w macicy [15,35]. Cykl miesięczkowy składa się z trzech faz: folikularnej, owulacyjnej oraz lutealnej (Rys. 2.). Faza folikularna zachodząca w jajnikach obejmuje rozwój pęcherzyków pierwotnych zawierających niedojrzałą, otoczoną monowarstwą komórek ziarnistych, komórkę jajową. Proces ten prowadzi do przejścia wybranych pęcherzyków ze stadium pierwotnego do prenatalnego, czemu towarzyszy powiększenie średnicy komórki jajowej z 20 do 80 μm . W 6.-8. dniu cyklu następuje wybór pęcherzyka dominującego, rozwój pozostałych pęcherzyków jest hamowany, a pęcherzyk dominujący przechodzi w stadium przedowulacyjne. Dojrzały pęcherzyk jajowy nazywany jest pęcherzykiem Graffa. W fazie owulacyjnej dochodzi do destabilizacji i pęknięcia ściany pęcherzyka oraz do wzrostu ciśnienia w płynie pęcherzykowym, co prowadzi do uwolnienia komórki jajowej czyli owulacji, zwanej również jajczkowaniem. Po pęknięciu pęcherzyka rozpoczyna się faza lutealna, w czasie której pęknięty pęcherzyk przekształca się w ciało żółte. Po 8-9 dniach od jajczkowania obserwowany jest szczyt waskularyzacji czyli unaczynienia ciała żółtego. W przypadku gdy nie dochodzi do ciąży, po upływie 10-11 dni od owulacji, ciało żółte ulega regresji czyli zanikaniu, a cykl na nowo się rozpoczyna. Jeśli natomiast następuje zapłodnienie, istnienie ciała żółtego wspomagającego prawidłowy rozwój

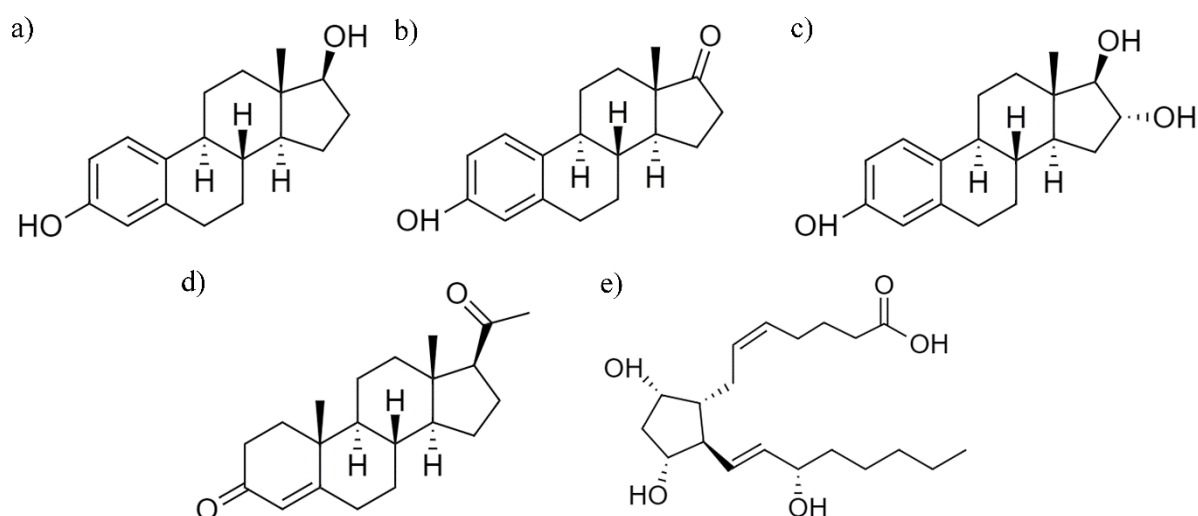
ciąży zostaje podtrzymane do około 10. tygodnia ciąży, kiedy jego funkcję przejmuje łożysko [15].



Rysunek 2. Schemat jajnikowego cyklu miesięczkowego. Na podstawie: [36].

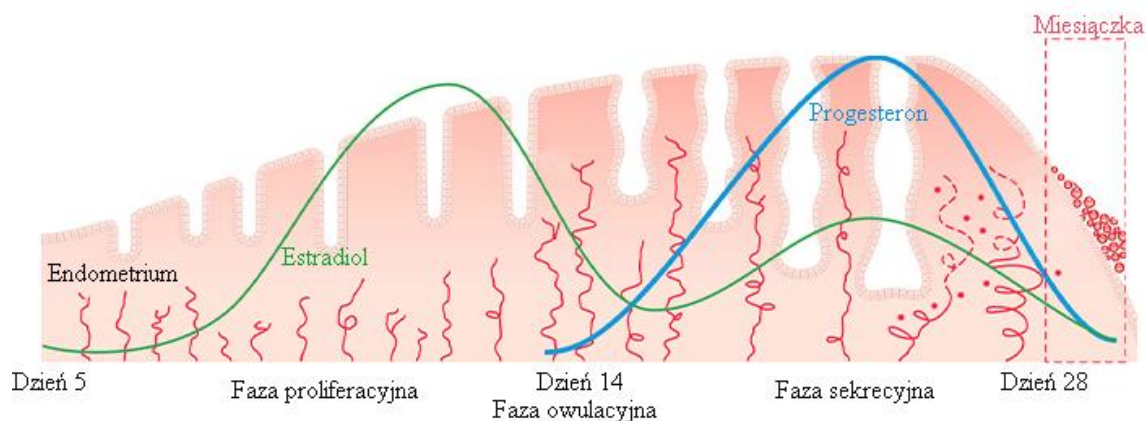
Poszczególne etapy cyklu miesięczkowego są regulowane przez hormony produkowane w mózgu, przez podwzgórze i przysadkę oraz w jajnikach. W podwzgórzcu produkowane są dwie grupy hormonów: liberyny (uwalniające) oraz statyny (hamujące), a ich podstawowa rolą jest regulacja pracy przysadki. W przysadce syntetyzowanych jest 6 hormonów: adrenokortykotropina (ACTH, ang. *adrenocorticotropic hormone*), tyreotropina (TSH, ang. *thyroid-stimulating hormon*), hormon wzrostu (GH, ang. *growth hormon*), prolaktyna (PRL), folitropina (FSH) oraz lutropina (LH). Szczególnie istotną funkcję w regulacji cyklu miesięczkowego odgrywają glikoproteiny FSH oraz LH. Są one odpowiedzialne za stymulację rozwoju i wzrostu pęcherzyków w jajniku (FSH) oraz procesu owulacji i rozwoju ciała żółtego (LH). Hormony wydzielane przez jajniki należą do hormonów steroidowych, posiadających 18 (C-18), 19 (C-19) lub 21 (C-21) atomów węgla w cząsteczce. Grupę hormonów C-18 tworzą estrogeny, do których należą 17β -estradiol (Rys. 3a), estron (Rys. 3b) oraz estriol (Rys. 3c). Różnią się one obecnością odpowiednio grupy ketonowej, grupy hydroksylowej, oraz dwóch grup hydroksylowych, przy czym najwyższą aktywność biologiczną wykazuje 17β -estradiol. Do biologicznego

działania estrogenów należy między innymi wspomaganie proliferacji, czyli namnażania komórek endometrium oraz przygotowanie na działanie innego hormonu- progesteronu. Progesteron jest naturalnie występującym w organizmie kobiecym gestagenem, będącym hormonem steroidowym C-21 (Rys. 3d), produkowanym przez ciało żółte oraz łożysko. Stężenie progesteronu w fazie folikularnej jest bardzo niskie (około 0,9 ng/ml) i stopniowo wzrasta, aby w środku fazy lutealnej osiągnąć wartość 10-20 ng/ml (Rys. 4). Do zadań biologicznych progesteronu należy między innymi przygotowanie macicy do ciąży poprzez wywoływanie zmian sekrecyjnych w endometrium, doprowadzanie do rozpułchnienia i przekrwienia, oraz zmniejszania kurczliwości macicy. Progesteron odpowiada również za zahamowanie rozwoju pęcherzyków w jajniku, po wyborze pęcherzyka dominującego [15]. Jedną z grup hormonów syntezowanych w endometrium przez komórki nabłonkowe oraz komórki podścieliska są prostaglandyny (PG), będące pochodnymi kwasu arachidowego [37]. Hormony te, zwłaszcza forma $\text{PGF}_{2\alpha}$ (Rys. 3e)), są odpowiedzialne za wywoływanie i hamowanie skurczy mięśni gładkich, w tym macicy [38] oraz złuszczenie endometrium, czego skutkiem jest krwawienie miesiączkowe [15].



Rysunek 3. Wzory strukturalne estrogenów: 17β-estradiolu (a), estronu (b), estradiolu (c), progesteronu (d) oraz prostaglandyny $\text{PGF}_{2\alpha}$ (e).

Z uwagi na rozpatrywany obszar układu rozrodczego wyróżnić można cykl jajnikowy, endometrialny oraz szyjkowy. Cykl endometrialny dotyczy zmian zachodzących w obrębie endometrium (Rys. 4.), będących odpowiedzią na procesy przebiegające w jajnikach i obejmuje fazę miesiączkową, proliferacyjną, owulacyjną oraz sekrecyjną. Podczas fazy miesiączkowej przypadającej na 1.-5. dzień prawidłowego,

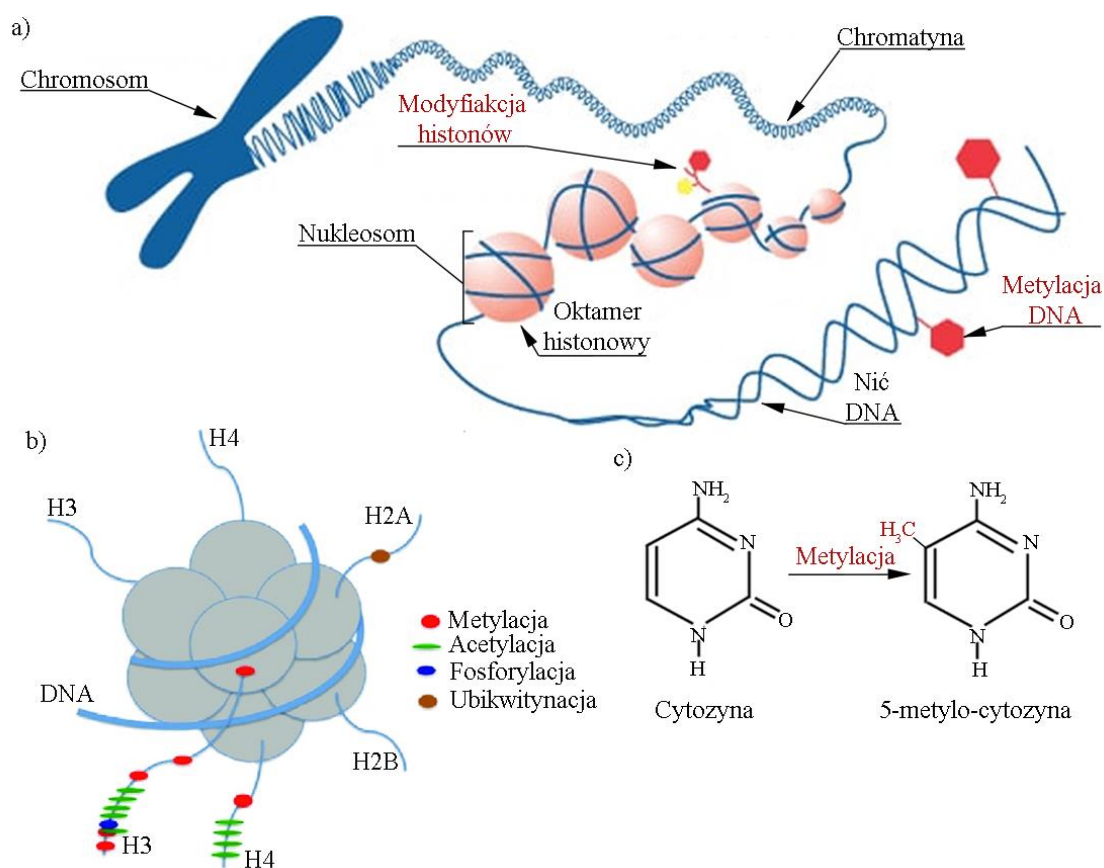


Rysunek 4. Zmiany ekspresji hormonów oraz towarzyszące im przemiany w obrębie endometrium w czasie cyklu miesięczkowego. Na podstawie: [41].

28-dniowego cyklu dochodzi do złuszczenia czynnościowej warstwy błony śluzowej macicy. W procesie tym udział biorą prostaglandyny odpowiedzialne za obkurczanie wrastających w głąb endometrium tzw. tętnic spiralnych oraz wywołują skurcze macicy. W wyniku złuszczenia, w macicy pozostaje tylko bardzo cienka, grubości ok 0,5 mm, warstwa podstawowa błony śluzowej. Faza proliferacyjna, trwająca od 6. do 13. dnia cyklu i kontrolowana poprzez działanie estrogenów, jest powiązana z procesem wzrostu pęcherzyków w jajnikach. W macicy następuje wówczas stopniowe odbudowywanie nabłonka, prowadzące do pogrubienia błony śluzowej, w obrębie której dochodzi również do wzrostu liczby oraz objętości gruczołów, a także stopnia unaczynienia. Dalsze pogrubianie endometrium jest obserwowane również w fazie owulacyjnej czyli w 14. dniu cyklu. Ostatnim etapem, przypadającym na 15.-28. dzień cyklu, jest faza sekrecyjna, podczas której zmiany zachodzące w endometrium są kontrolowane przez progesteron. Zachodzące w tej fazie dalsze zwiększanie grubości endometrium, zwiększanie szerokości i faliste kształtowanie się gruczołów, obrzęk tkanki łącznej endometrium, a także gromadzenie glikogenu, białek oraz lipidów mają na celu przygotowanie błony śluzowej do zagnieżdżenia zarodka. Według doniesień literaturowych za niezbędne dla powodzenia implantacji zmiany w endometrium można uznać zróżnicowanie komórek zrębu w wyspecjalizowane wydzielnicze komórki decidualne [20], które umożliwiają inwazję i zapewniają prawidłowe odżywianie zarodka [21]. Proces ten, nazywany decidualizacją, rozpoczyna się w 22 dniu cyklu [39] i będąc odpowiedzią na działanie progesteronu, przebiega niezależnie od obecności zarodka [40]. W wyniku decidualizacji dotychczas wydłużone komórki zrębu ulegają zaokrągleniu. Dochodzi ponadto do zmian w ekspresji białek, między innymi do znacznego wzrostu ekspresji e-kadheryny

uczestniczącej w adhezji pomiędzy komórkami. Zmieniają się również właściwości mechaniczne komórek, które w wyniku decidualizacji stają się bardziej miękkie i podatne na odkształcenie. [20]. Brak zapłodnienia skutkuje tzw. okresem niedokrwienia objawiającym się między innymi zapadaniem się cew gruczołowych [15].

Przemiany zachodzące w czasie cyklu, implantacji i ciąży w obrębie endometrium, związane ze wzrostem i różnicowaniem się komórek, mogą przebiegać jedynie przy odpowiednich zmianach w ekspresji genów, procesie polegającym na odczytaniu informacji genetycznej i wyrażeniu jej poprzez utworzenie produktu w postaci białka lub kwasu rybonukleinowego (RNA, ang. *ribonucleic acid*). Zaburzenia w ekspresji genów mogą stanowić, między innymi, przyczynę niepowodzeń implantacji. Epigenetyczne, czyli niezwiązane ze zmianami w sekwencji nukleotydów w kwasie deoksyrybonukleinowym (DNA, ang. *deoxyribonucleic acid*), modyfikacje w ekspresji genów są kontrolowane różnymi czynnikami, między innymi enzymami oraz białkami. Jednym z mechanizmów modyfikacji ekspresji genów jest metylacja DNA, czyli przyłączenie grup metylowych $-CH_3$ do zasad azotowych nukleotydów, w szczególności cytozyn [19,42]. Regulację procesu czytania genów można wyjaśnić również poprzez mechanizm związany z modyfikacją histonów (Rys. 5)- niewielkich zasadowych białek stanowiących rdzeń, na który nawinięte są nici DNA (Rys. 5a) [19]. Jednymi z czynników, powiązanych ze stężeniem estrogenów, są czynniki wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF, ang. *vascular endothelial growth factor*) należące do cytokin [43] i stanowiące grupę białek występujących w postaci glikozyłowanego homodimeru [44]. VEGF uczestniczy szczególnie w angiogenezie, czyli procesie tworzenia naczyń włosowatych. Ekspresja mRNA dla VEGF w fazie proliferacyjnej jest obserwowana szczególnie w komórkach zrębu, natomiast w fazie sekrecyjnej dominuje ekspresja gruczołowa, przy czym ekspresja mRNA dla VEGF w fazie sekrecyjnej jest od trzech do pięciu razy wyższa niż w fazie proliferacyjnej [19]. Zmiany ekspresji mRNA są zależne również od działania enzymu, metylotransferazy DNA (DNMT, ang. *DNA methyltransferase*), który powoduje metylację DNA (Rys. 5c). Zmiany w działaniu enzymu DNMT w czasie cyklu skutkują znacząco niższą ekspresją mRNA dla DNMT w środkowej fazie sekrecyjnej w porównaniu z fazą proliferacyjną, co może być powiązane z procesem decidualizacji [42]. Modyfikacja histonów obserwowana w czasie procesu decidualizacji jest kontrolowana przez pozostające w odpowiednich proporcjach enzymy, cetylotransferazy histonowe (HATs, ang. *Histone acetyltransferases*)



Rysunek 5. Modyfikacje histonów oraz metylacja DNA. a) Nić DNA jest nawinięta na oktamer histonowy, tworząc w ten sposób nukleosomy. DNA wraz z histonami wchodzi w skład chromatyny, stanowiącej główny składnik chromosomów. Na podstawie: [45]. b) Oktamer histonowy tworzą 4 pary histonów (H2A, H2B, H3 i H4). Do modyfikacji histonów należą: metylacja (podstawienie grupą metylową CH₃-), acetylacja (podstawienie grupą acetylową CH₃C(O)-), fosforylacja (podstawienie resztą fosforanową PO₄-), ubikwitynacja (przyłączenie białka ubikwityny). Na podstawie: [46]. c) Metylacja DNA poprzez przyłączenie grupy metylowej do cytozyny- jednej z zasad pirymidynowych. Na podstawie: [47].

deacetylazy histonowe (HDACs, ang. Histone deacetylases) oraz inhibitor HDAC, Trichostatynę A (TSA, ang. *Trichostatin A*) [19] i skutkuje ekspresją markerów białkowych, takich jak białka wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGFBP-1, ang. *insulin-like growth factor binding protein 1*) czy prolaktyna, należące do markerów decidualizacji [19-20]. Decidualizacji towarzyszy ponadto ekspresja genu receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) [20]. EGFR należy do receptorowych kinaz tyrozynowych i stanowi czynnik regulujący funkcjonowanie endometrium, kluczowy dla regulacji procesu decidualizacji, a jednocześnie istotny na wczesnym etapie ciąży m.in. ze względu na udział w aktywacji receptorów estrogenu [48]. Również proces implantacji jest

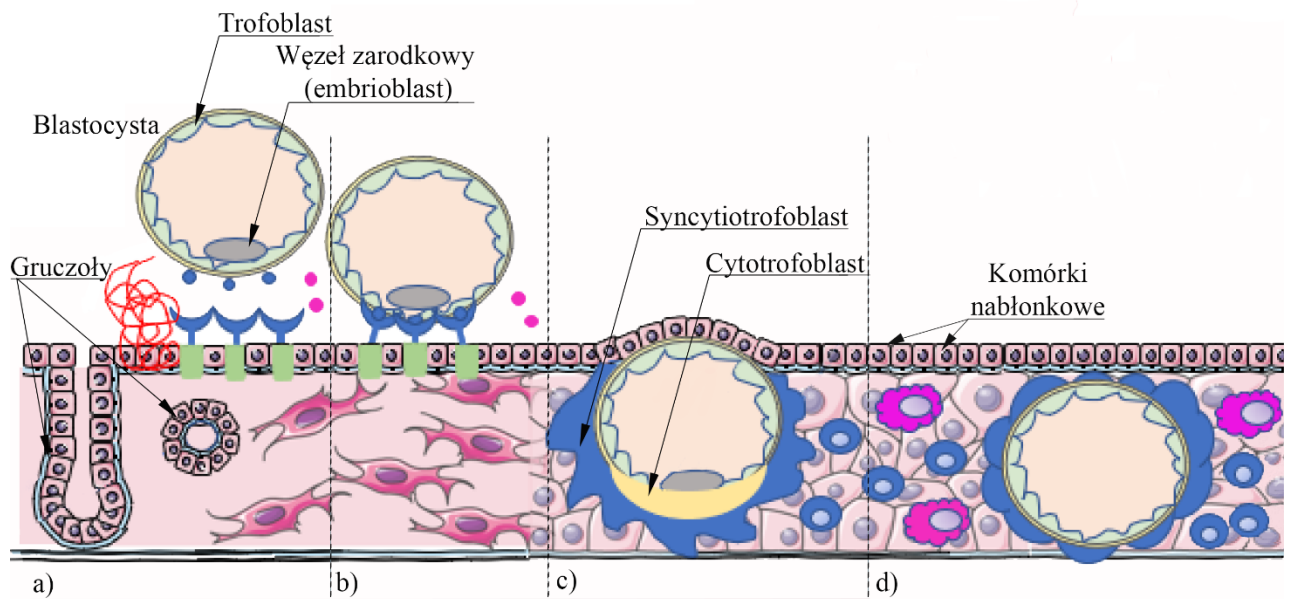
powiązany ze zmianami w ekspresji genów, które są związane z modyfikacją histonów oraz metylacją DNA. W okresie zagnieżdżenia zarodka obserwowana jest ekspresja genów dla enzymów z grupy metaloproteinaz macierzy zewnątrzkomórkowej (MMPs, ang. *matrix metalloproteinases*), oraz następujących białek: enzymów białek należących do tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMPs, ang. *tissue inhibitors of metalloproteinases*), hamujących aktywność MMPs, czynnika z grupy cytokin hamujących białaczkę (LIF, ang. *leukemia inhibitory factor*) [19], białek homeotycznych Hox-A10 należących do czynników transkrypcyjnych (HOXA10, ang. *Homeobox A10*) [19,49], E-kadheryny (E-cadherin, ang. *epithelial cadherin*) oraz mucyny-1 (MUC1, ang. *mucin1*) [19].

Najważniejsze zmiany strukturalne obserwowane w czasie cyklu miesięczkowego i związane z receptywnością endometrium mogą być analizowane w oparciu o porównanie biopsji pobieranych pomiędzy 19 a 21 dniem cyklu, od kobiet płodnych oraz pacjentek z powtarzającymi się (co najmniej trzema) niepowodzeniami implantacji (RIF, ang. *repeated implantation failure*). Prowadzone w tym zakresie badania z zastosowaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, ang. *transmission electron microscope*) pozwalają na powiązanie płodności z obecnością lub zanikaniem takich struktur jak pinopody oraz mikrokosmki i rzęski [21]. Pinopody są cytoplazmatycznymi uwypukleniami znajdującymi się na nabłonkowej powierzchni endometrium, których obecność jest kontrolowana przez działanie progesteronu [50]. Dobrze rozwinięte pinopody, pojawiające się w fazie lutealnej, zidentyfikowano u większości badanych kobiet płodnych, podczas gdy w grupie kobiet z RIF zaobserwowano nieliczne i słabo rozwinięte struktury, co związane jest z niewystarczającym wzrostem warstwy nabłonkowej. Analiza mikrofotografii TEM uwiarydociła również, że pinopody są wypełnione materiałem wydzielniczym, służącym do odżywiania zarodka, oraz pozwalającym na jego przyłączenie do endometrium. Ocenia się, że pinopody mogą stanowić marker receptywności, stanowiąc również wyznacznik wejścia endometrium w stadium o najwyższej płodności. Cechą charakterystyczną dla endometrium w fazie lutealnej jest również obecność mikrokosmków, podobnie jak pinopody wrażliwych na działanie progesteronu. Liczba i rozmiar mikrokosmków zmienia się wraz ze zmianą gęstości pinopodów i w przypadku kobiet płodnych jest mniejsza niż w przypadku pacjentek z RIF, gdyż wraz z rozwojem pinopodów mikrokosmki ulegają skracaniu, a czasem również zacieraniu. Komórki

nabłonkowe posiadają rzęski, które zanikają w fazie lutealnej, a ich obecność, stwierdzona u grupie kobiet z RIF stanowi czynnik świadczący o niepłodności, gdyż rzęski mogą utrudniać przyłączenie zarodka do endometrium [21].

3.3. Implantacja

Najważniejszą rolą jaką pełni endometrium jest zapewnienie miejsca i warunków do zagnieżdżenia się, czyli implantacji zarodka w macicy, a następnie umożliwienie jego wzrostu i rozwoju. Proces ten możliwy jest w ograniczonym przedziale czasowym zwanym oknem implantacji, przypadającym na 16-22 dzień prawidłowego cyklu miesięczkowego. Wyróżnia się zasadniczo trzy fazy implantacji [51] (Rys. 6.), jednak w niektórych opracowaniach uwzględniony jest dodatkowy, początkowy etap wstępnego oddziaływania zarodka z endometrium [52]. Powszechnie za pierwszą fazę implantacji uznaje się kontakt (apozycję) zarodka w stadium blastocysty z pinopodami. Na tym etapie dochodzi do zróżnicowania komórek zarodka na trofoblast, czyli zewnętrzną warstwę komórek oraz węzeł zarodkowy (embrioblast). Z kolei komórki stromalne endometrium znajdujące się w pobliżu miejsca implantacji ulegają w tym czasie procesowi decidualizacji. Następnie dochodzi do adhezji białka L-selektyny zewnętrznych komórek blastocysty do oligosacharydowych ligandów komórek nabłonkowych endometrium (Rys. 6b)). Proces ten jest regulowany przez molekuly adhezyjne, m.in. integryny należące do transnabłonkowych receptorów glikoproteinowych [51] i jest uznawany za kluczowy dla powodzenia implantacji [53-55]. Brak ekspresji integryny VLA-4 (ang. *Very Late Antigen*- antygen bardzo późny) podczas okna implantacyjnego może przyczyniać się do występowania niepłodności niewyjaśnionej [56]. W końcowym kroku dochodzi do penetracji (inwazji) zarodka poprzez komórki nabłonkowe endometrium do komórek zrębu (Rys. 6c)). Podczas tej fazy, początkowo jednolity trofoblast różnicuje się na wewnętrzną warstwę cytotrofoblatu oraz zewnętrzną warstwę syncytiotrofoblastu tworzącego zewnętrzną część łożyska. Zdolność do inwazji i przenikania przez błonę oddzielającą komórki nabłonkowe i komórki zrębu przypomina właściwości charakterystyczne dla komórek złośliwych, jednak w przypadku implantacji proces ten powinien być ściśle kontrolowany przez czynniki regulujące wzrost oraz przez cytokiny i enzymy [51].



Etapy przebiegające w czasie okna implantacyjnego

Częsteczki uczestniczące w procesie implantacji

- L-selektyna
- Mucyna 1
- Komórki naturalnego zabiójcy macicznego

Elementy strukturalne tkanki

- Pinopody
- Ligandy
- L-selektyny
- Komórki zrębu
- Komórki decidualne
- Makrofagi
- Czynniki hamujące białaczkę

Rysunek 6. Schemat przebiegu procesu implantacji oraz towarzyszącej mu decidualizacji komórek endometrium a) apozycja, b) adhezja, c) inwazja, d) rozwój zarodka wewnątrz tkanki. Na podstawie: [57].

3.4. Choroby i zmiany patologiczne w obrębie endometrium

3.4.1. Niepłodność

Zgodnie z definicją podaną przez WHO w 2009 roku, niepłodność (ang. *infertility*) jest rozumiana jako niemożność zajścia w ciążę przez ponad 12 miesięcy, pomimo regularnego współżycia, z częstotliwością średnio 3-4 razy w tygodniu, oraz przy nie stosowaniu środków antykoncepcyjnych [58]. Choroba [59] ta dotyka 10-15% par w wieku reprodukcyjnym [15,60-61], przy czym 35-50% przypadków niepłodności jest przypisywane czynnikiowi wyłącznie kobiecemu, 20-40% czynnikiowi wyłącznie męskiemu, 20-30% wynika z kombinacji czynników kobiecych i męskich [15,60-63], jednak u nawet 20-30% przypadków nie można określić jednoznacznie czynnika odpowiedzialnego za niepłodność [13-15]. Niepłodność związana jest z czynnikiem demograficznym [5]. Szacuje się, że w Polsce problem niepłodności może dotyczyć ponad miliona par, jednak jedynie 20% z nich szuka pomocy medycznej. W polskiej medycynie wyróżnia się dwa pojęcia dotyczące niepłodności: *sterilitas* rozumiane jako

niemożność zajścia w ciążę, oraz *infertilitas* dotyczące problemu z donoszeniem ciąży. W przypadku niemożności zajścia w ciążę wyróżnia się niepłodność pierwotną występującą u kobiet niebędących nigdy w ciąży oraz częściej występującą niepłodność wtórną [5], dotyczącą kobiet, które posiadają naturalnie poczęte potomstwo, ale nie mogą ponownie zajść w ciążę [64-65]. Jediną możliwością potwierdzenia płodności jest urodzenie dziecka (ang. *taken home baby*) [15].

Zaburzenia związane z płodnością mogą dotyczyć powstawania zarodka oraz jego zagnieżdżenia w endometrium. Procesy te są złożone i ich przyczyny mogą być związane w przypadku kobiet z nieprawidłową pracą jajnika, jajowodu, z zaburzeniami w obrębie macicy i szyjki macicy, natomiast u mężczyzn mogą wynikać z małej liczby plemników, ich zbyt małej ruchliwości lub nieodpowiedniej budowy [15].

Do problemu z płodnością związanego z czynnikiem jajnikowym prowadzić mogą zaburzenia fazy lutealnej, podczas której pomimo prawidłowego funkcjonowania ciała żółtego obserwowane jest obniżenie stężenia progesteronu, bądź skrócenie tej fazy w stosunku do regularnego cyklu, w którym trwa ona 10-12 dni [15]. Zaburzenia cyklu miesięczkowego skutkujące niemożnością zajścia w ciążę mogą być związane również z oligoowulacją, która polega na nieczęstych, występujących mniej niż 8 razy w roku krwawieniach miesięczkowych, a także z anowulacją, w przypadku której dochodzi do zaburzenia rytmu miesiączek i całkowitego braku krwawienia miesięczkowego [15,66]. Anowulacja to zaburzenie, które w największym stopniu upośledza działanie jajników. Brak jajeczkowania może wynikać z niewydolności przysadkowo-podwzgórzowej, między innymi w zespole policystycznych jajników (PCOS, ang. *Polycystic ovary syndrome*), który dotyka 6-15% kobiet w wieku rozrodczym [67]. PCOS objawia się zaburzeniami miesięczkowania i wielotorbielowatą strukturą jajnika widoczną w obrazie ultrasonograficznym (USG), za którą odpowiedzialne są znajdujące się w jajniku zatrzymane w rozwoju pęcherzyki jajnikowe. Ponadto brak miesięczkowania może wynikać z przedwczesnego wygasania czynności jajnika (POF, ang. *premature ovarian failure*) [15].

Z czynnikami jajowodowymi związane jest 30-35% [68-69] przypadków niepłodności. Przemijająca lub stała niedrożność jajowodów uniemożliwia transport spermy oraz komórki, która na tym etapie zostaje zapłodniona [69]. Do uszkodzeń jajowodów należą zrosty okołojajnikowe, będące najczęściej następstwem zabiegu

operacyjnego lub przebytego stanu zapalnego w obrębie miednicy [68], który prowadzi jednocześnie do tworzenia się wodniaków jajowodów powstających w wyniku gromadzenia się płynu surowiczego w jajowodzie [15]. Do zaburzeń funkcji jajowodów mogą przyczynić się zmiany patologiczne w fałdach śluzówki, stany zapalne lub endometrioza, a także uszkodzenia śluzówki jajowodu ograniczające funkcje transportowe [68,70] oraz patologia strzępków, stanowiących zakończenie więzadła lejkowo-miednicowego przyłączającego jajowód do jamy macicy i pozwalających na wychwytywanie komórek [15].

Maciczne czynniki niepłodności utrudniają lub uniemożliwiają zagnieżdżenie zarodka i mogą wynikać z wad wrodzonych macicy takich jak przegrody wewnątrzmaciczne lub być związane z obecnością takich zmian patologicznych jak zrosty wewnątrzmaciczne [15], będące najczęściej powikłaniem po zabiegach w obrębie macicy w tym wyłyżeczkowaniach, cesarskim cięciu, aborcji oraz poronieniach naturalnych [71]. Obszar zrostu powstającego jako nieprawidłowe zwłóknienie związane m.in. ze spadkiem aktywności fibrolitycznej mogącym być następstwem fizjologicznych procesów towarzyszących ciąży [72] charakteryzuje się spadkiem mobilności oraz elastyczności [73]. Szacuje się, że u 50% kobiet po przebytym cesarskim cięciu dochodzi do powstania przestrzeni w bliźnie, nazywanej niszą lub łożą, oznaczającej braku ciągłości mięśnia macicy. Niecałkowity zrost rany po cesarskim cięciu może być przyczyną pęknięcia i rozejścia się blizny podczas kolejnej ciąży [74]. Ponadto obszar blizny jest szczególnie narażony na inwazję trofoblastu, co może skutkować nieprawidłowym zagnieżdżeniem zarodka co z kolei prowadzi do patologii łożyska pod postacią łożyska przodu lub przyrośniętego [75]. Implantacja zarodka jest również ograniczona występowaniem w macicy łagodnych zmian w postaci polipów [15] diagnozowanych u 15-24% kobiet z niepłodnością [76], oraz mięśniaków [15] identyfikowanych u 30-40% kobiet, w tym u 2,4% pacjentek niepłodnych [77]. Polipy stanowią formę łagodnych rozrostów endometrium o wielkości rzędu od kilku milimetrów do kilku centymetrów, tworzących się w błonie śluzowej macicy [78], podczas gdy mięśniaki są niezłośliwymi guzami nowotworowymi występującymi w obszarze tkanki mięśniowej [77]. Chociaż etiologia rozwoju polipów pozostaje niejasna, uważa się, że tworzą się one prawdopodobnie na skutek ogniskowego przerostu zrębu i gruczołów, a ich powstawanie związane jest z działaniem estrogenów [79]. Początkowe stadium rozwoju polipa, gdy widoczne są ogniska, z których może

potencjalnie wytworzyć się polip, określane jest jako polipowato uformowana błona. Małe zmiany o długości zazwyczaj 1-2 mm klasyfikowane są jako mikropolipy i są one najczęściej niewykrywalne technikami ultrasonograficznymi. Mikropolipy należą do częstych schorzeń współistniejących przy endometriozie [80]. Choć polipy są zazwyczaj zmianami nienowotworowymi, niektóre polipy (polipy w stanie przedrakowym) mogą się rozwinąć w raka [78], a ryzyko rozwoju raka u kobiet ze zdiagnozowanymi polipami jest szacowane na 0-4,8% [81].

Czynnik szyjkowy związany jest z nieodpowiednim stopniem otwarcia kanału szyjki macicy lub z nieprawidłowymi parametrami śluzu, takimi jak jego ilość, przejrzystość i ciągliwość, które mogą być związane ze stanami zapalnymi pochwy lub zaburzeniami w wydzielaniu hormonów, które regulują zmiany śluzu w trakcie cyklu miesięczkowego [15].

Powodzenie w procesie zapłodnienia komórki jajowej oraz w zagnieżdżeniu zarodka nie gwarantują donoszenia ciąży. *Infertilitas* rozumiane jako niemożność donoszenia ciąży jest związane z wydalaniem jaja płodowego z jamy macicy do 22. tygodnia ciąży, co obserwowane jest w przypadku 15% ciąż. Poronienia powtarzające się więcej niż trzykrotnie określa się jako nawykowe. Poronienia mogą mieć podłoże genetyczne, hormonalne, być związane z nieprawidłową budową macicy m.in. ze zrostami wewnątrzmacicznymi, mięśniakami, endometriozą, oraz niewydolnością szyjki macicy [15]. Również zaburzenia w przebiegu inwazji zarodka, związane np. z zespołem antyfosfolipidowym przyczyniającym się do zahamowania inwazji mogą prowadzić m.in. do nawracających poronień [82].

Proces zagnieżdżenia zarodka warunkujący płodność jest kontrolowany przez równoległe działanie wielu czynników opisanych szerzej w rozdziale 3.2. niniejszej rozprawy, w tym hormonów, enzymów i białek wywołujących zmiany morfologiczne i czynnościowe w macicy. Zakłócenia w działaniu tych czynników mogą skutkować niepłodnością lub prowadzić do poronień.

Leczenie niepłodności może przebiegać na drodze chirurgicznego usunięcia nieprawidłowości znajdujących się w obrębie jajowodów i macicy, m.in. zrostów, przegród, mięśniaków [15] i polipów [76,80], jednak badania pokazują, że wskaźnik płodności u pacjentek po usunięciu polipa wynosi 23-65%, co oznacza, że leczenie chirurgiczne nie gwarantuje wyleczenia niepłodności [78]. W leczeniu niepłodności

stosuje się również farmakoterapię, opierającą się na terapii hormonalnej. Istnieją ponadto techniki rozrodu wspomaganego (ART, ang. *assisted reproductive technics*), do których należą m.in. bezpośrednie podanie plemników do macicy (inseminacja domaciczna) oraz zapłodnienie pozaustrojowe z następnym umieszczeniem zarodka w macicy (IVF, ang. *in vitro fertilisation*) [15].

3.4.2. Endometrioza

Endometrioza jest definiowana jako występowanie endometrium poza jamą macicy, w szczególności w obszarze miednicy, a więc w jajnikach, w obszarze więzadeł krzyżowo-maciczych oraz otrzewnej [83], przegrody odbytniczo-pochwowej, a także jelit i pęcherza [83]. Choroba ta dotyka 5-10% kobiet w wieku rozrodczym [17,83] i objawia się niepłodnością oraz bólem odczuwanym w okolicy miednicy w czasie i po stosunku [83], ale również cyklicznie w czasie miesiączki [17] lub w trakcie całego cyklu miesięczkowego [83]. Pod względem histologicznym wyróżnia się trzy typy endometriozy: typ śluzówkowy, występujący w torbielach endometrialnych jajnika, typ otrzewnowy charakteryzujący się wielogniskowością oraz różnorodnością morfologiczną zależną od stadium choroby, oraz typ gruczolakowy, w którym obserwowana jest obecność zwłaszcza tkanki włóknisto-mięśniowej, a nie tkanki endometrialnej [15]. Chociaż w chorobie tej dochodzi do implantacji poza obrębem macicy zarówno komórek zrębu jak i nabłonkowych, badania wykazują, że w niektórych wycinkach tkanki ektopowej, czyli występującej w innym niż fizjologicznie miejscu, występują tylko komórki zrębu. W praktyce klinicznej uważa się, że sama obecność komórek zrębu poza jamą macicy jest wystarczającą przesłanką do zdiagnozowania endometriozy. U pacjentek z endometriozą zaobserwowano ponadto zdolność komórek zrębu do skurczu i migracji [31]. W przypadku gdy dochodzi do przerostu błony śluzowej macicy w głąb myometrium schorzenie to jest określane jako adenomioza [84].

Etiopatogeneza endometriozy nie została dotąd jednoznacznie stwierdzona, gdyż żadna z dostępnych teorii nie wyjaśnia wszystkich diagnozowanych przypadków. Spośród opisanych teorii szczególnie popularna jest w ostatnich latach teoria transplantacji opierająca się o obserwację występowania miesiączkowania wstecznego, polegającego na przemieszczaniu się krwi miesięczkowej zawierającej nieobumarłe, zdolne do implantacji fragmenty złuszczonej błony śluzowej przez jajowody do jamy otrzewnej. Zjawisko to jest obserwowane u wszystkich kobiet, jednak u niektórych

dochodzi do implantacji złuszczonej komórki, co powoduje rozwój endometriozy. Jest to związane z zaburzeniami układu immunologicznego. Inną możliwą przyczyną tego schorzenia opisuje teoria metaplastyki, polegającej na patologicznej zmianie fizjologicznie występujących komórek na komórki innego rodzaju, w tym przypadku na przekształceniu w komórki błony śluzowej macicy. Dodatkowo endometrioza jest związana z działaniem czynników zewnętrznych, w tym dioksyn, indukujących metaplastykę, co opisuje teoria indukcji [15]. Nie bez znaczenia w patogenezie tej choroby są czynniki genetyczne, nieprawidłowy poziom estrogenów, wczesne miesiączkowanie oraz niski wskaźnik masy ciała (BIM, ang. *body mass index*) [17].

Endometrioza jest diagnozowana u ponad jednej trzeciej kobiet ze stwierdzoną niepłodnością [17], jednocześnie zwiększa ryzyko poronień, które występują u 40% pacjentek z tym schorzeniem. Niepłodność u pacjentek z endometriozą może być związana z występowaniem zrostów w jajowodzie, ograniczających jego aktywność motoryczną odpowiedzialną za transport w obrębie jajowodu lub powodujących całkowitą niedrożność. Endometrioza może skutkować ponadto upośledzeniem pracy jajnika, prowadząc do braku jajeczkowania związanego z zaburzeniami czynności wydzielniczej, luteinizacją niepękniętego pęcherzyka czyli zaburzeniem polegającym na niewalnianiu dojrzałej komórki jajowej z pęcherzyka, a także niewydolnością ciała żółtego. Niepowodzenia implantacji zarodka oraz samoistne poronienia u kobiet chorujących na endometriozę związane są z reakcją immunologiczną w tkance ekotopowej [15]. Dodatkowo endometrioza stanowi czynnik zwiększający 2-3 krotnie ryzyko zachorowania na raka jajnika, jednak pozostaje ono na poziomie 0,3-0,8% [17]. U pacjentek z endometriozą zaobserwowano również zwiększenie częstości występowania nowotworu piersi i czerniaka skóry [85].

W leczeniu endometriozy stosuje się metody chirurgiczne i farmakologiczne. Leczenie operacyjne obejmuje usunięcie ognisk choroby, jajnika lub macicy wraz z jajowodami i jajnikami. Wielkość usuwanego obszaru uzależniona jest od rozległości zmian. Ważnym aspektem leczenia kobiet pragnących posiadać potomstwo jest zachowanie płodności, dlatego u tych pacjentek dąży się do całkowitego usunięcia zmian przy jednoczesnym ograniczeniu ingerencji w narządy płciowe. Tak zwana terapia oszczędzająca prowadzi często do nawrotów endometriozy, co wiąże się z koniecznością bardziej radykalnego postępowania, a w ostateczności do usunięcia jajników. Leczenie farmakologiczne, oprócz działania przeciwbólowego, opiera się na terapii hormonalnej,

mającej na celu ograniczanie czynności jajników oraz doprowadzenie do zaniku ognisk endometriozy [15].

3.4.3. Nowotwory endometrium

Nowotwory endometrium należą do najczęściej diagnozowanych nowotworów ginekologicznych, szczególnie w krajach rozwiniętych. Zapadalność na ten typ nowotworu wzrasta i podczas gdy w 2016 roku znajdował się na piątym miejscu pod względem częstości występowania [86], w 2018 znalazł się na miejscu czwartym [87]. Szczególnie dużą zachorowalność odnotowuje się w Ameryce Północnej oraz Europie Zachodniej [88], a wzrost liczby diagnozowanych przypadków w tych regionach jest wiązany z otyłością, ze starzeniem się społeczeństwa, oraz występowaniem zespołu metabolicznego, wiążącego się między innymi z podwyższonym ciśnieniem i zaburzeniem poziomu glukozy, trójglicerydów oraz cholesterolu HDL (ang. *High Density Lipoprotein*- alfa-lipoproteina o dużej gęstości) [86]. Wczesne zdiagnozowanie nowotworu endometrium daje dobre rokowania na wyzdrowienie, jednak u osób, u których występują nawroty choroby i przerzuty, mediana przeżycia (MOS, ang. *median overall survival*), czyli czas po którym 50% chorych zmarło, jest niewielka [88]. Pod względem śmiertelności nowotwory endometrium znajdują się na 14 pozycji. Nowotwór endometrium jest powszechnie uznawany za chorobę dotyczącą kobiety w okresie menopauzy, jednak u 14% pacjentek jest on diagnozowany przed menopauzą, a u 5% z nich przed ukończeniem 40 roku życia [86].

W zależności od cech histologicznych wyróżnia się dwa typy nowotworu. Typ I to gruczolakorak endometrioidalny o niskim stopniu złośliwości, stanowiący 80–90% wszystkich rozpoznań [86,89], którego powstawanie związane jest z nadmiernym oddziaływaniem estrogenów [15], natomiast typ II to gruczolakorak nieendometrioidalny, z którym wiąże się wysokie ryzyko przerzutów oraz nawrotów, a rokowania są najczęściej złe [86,89]. Według klasyfikacji molekularnej nowotwory endometrium dzieli się na cztery kategorie, związane z mutacjami prowadzącymi do rozwoju nowotworu [90-91]. Przypisane w klasyfikacji zaburzenia sugerują, że rozwój nowotworów związany jest z mutacjami somatycznymi, a więc nie są one dziedziczne [90]. Ważną rolę w tworzeniu i wzroście nowotworów endometrium odgrywa proces angiogenezy, kontrolowany między innymi przez VEGF, najsilniejszy i najbardziej specyficzny czynnik wzrostu śródbłonna naczyń, niezbędny w procesach

fizjologicznych, ale jednocześnie odgrywający znaczącą rolę w rozwoju zmian patologicznych [92].

Nowotwory endometrium najczęściej leczy się chirurgicznie, usuwając macicę wraz z jajnikami i jajowodami, oraz węzły chłonne miednicy, jeśli widoczne są przerzuty w tym obszarze. Radioterapia stanowi leczenie uzupełniające leczenie chirurgiczne, a także stosowana jest w przypadkach, gdy leczenie chirurgiczne jest niemożliwe [15].

4. Wybrane metody badań w analizie i diagnostyce chorób endometrium

Właściwości endometrium, zarówno morfologiczne, strukturalne jak i związane z prawidłową gospodarką hormonalną i białkową odgrywają kluczową rolę w prawidłowym funkcjonowaniu układu rozrodczego. Zrozumienie przebiegających w obrębie endometrium procesów, znaczenia jego budowy i struktury, jak również procesów prowadzących do rozwoju zmian patologicznych stanowi niezwykle ważne zagadnienie. Z tego względu prowadzi się w tym zakresie liczne badania, z wykorzystaniem powszechnie stosowanych w medycynie technik, a także poszukuje się nowych, szybszych, bardziej jednoznacznych, czy też dostarczających niedostępnych wcześniej informacji metod. Rozwój nowych metod jest szczególnie podyktowany faktem, że wczesne wykrycie zaburzeń, zwłaszcza nowotworowych, daje większe szanse na powrót do zdrowia [93-96]. Wybrane techniki stosowane w badaniach nad endometrium zostały przedstawione w tabeli 1.

Tabela 1. Wybrane metody analizy i diagnostyki endometrium wraz z przykładami zastosowania w badaniach nad endometrium.

Przeznaczenie	Nazwa techniki	Podstawa fizyczna	Przykład zastosowania
Obrazowanie	Ultrasonografia (USG)	Detekcja fali ultradźwiękowej o prędkości i częstotliwości zależnej od zjawisk falowych zachodzących wewnątrz tkanki	Analiza grubości endometrium w czasie cyklu i zmian związanych z rozwojem chorób [97-98]
	Mikroskopia optyczna	Powiększenie obiektu przy pomocy układ optycznego złożonego z zestawu soczewek	Ocena histopatologiczna biopsji endometrium [99-104] Klasyfikacja komórek z rozmazu cytologicznego z szyjki macicy o charakterze łagodnym i złośliwym [105]

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)	Detekcja elektronów przechodzących przez badaną próbkę	<p>Analiza kształtu komórek, obrazowanie połączeń międzykomórkowych [106]</p> <p>Porównanie ultrastruktury komórek od pacjentek płodnych i RIF [21]</p>
Skaningowa mikroskopia elektronowa (SEM)	Detekcja elektronów powstających w wyniku oddziaływania wiązki elektronów z próbką	<p>Analiza kształtu i powierzchni komórek [106]</p> <p>Analiza obecności charakterystycznych struktur na powierzchni komórki [107]</p>
Mikroskopia konfokalna	Zjawisko fluorescencji, promieniowanie rejestrowane w pojedynczych punktach próbki	<p>Detekcja białek stanowiących marker procesu, np. decidualizacji wraz z przejściem MET [20]</p> <p>Analiza ekspresji białek w wyniku działania wybranych czynników np. progesteronu [108]</p> <p>Śledzenie zmian w strukturze wewnętrznej komórek [31]</p>
Mikroskopia poklatkowa	Wykonanie wielu mikrofotografii w krótkich odstępach czasu	<p>Obserwacja zmian ruchliwości komórek związanych z endometriozą [31]</p>

	Mikroskopia sił atomowych (AFM)	Analiza oddziaływań pomiędzy ostrzem pomiarowym a próbką	Analiza zmian morfologicznych komórek nabłonkowych endometrium w wyniku działania hormonów, np. progesteronu [108] lub podczas procesu decidualizacji [20]
Analiza ekspresji genów i białek	Western blot	Elektroforetyczny rozdział białek i detekcja z udziałem przeciwciał	Analiza ekspresji białek np. GTPazy [31], MUC-1 [108], WT1 [109] w celu potwierdzenie lub wyjaśnienia obserwowanych procesów Monitorowanie ekspresji enzymu w wyniku działania siły rozciągającej w badaniach nad kurczliwością macicy [110]
	Reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR)	Powielanie łańcuchów DNA poprzedzone transkrypcją RNA do komplementarnego DNA	Analiza ekspresji genu <i>MUC-1</i> w wyniku działania wybranych czynników np. progesteronu [108] Pomiar poziomu <i>WT1</i> istotnego w kontekście płodności pacjentek z PCOS [109]

<p>Reakcja łańcuchowa polimerazy w czasie rzeczywistym (Real-Time PCR)</p>	<p>Ilościowa analiza PCR w oparciu o pomiar fluorescencji znakowanych fluorofortami reagentów</p>	<p>Pomiar poziomu genu <i>EGFR</i> w czasie trwania procesu decidualizacji [20] Monitorowanie ekspresji mRNA <i>Il-8</i> w wyniku działania siły rozciągającej w badaniach nad kurczliwością macicy [110]</p>
<p>Test immunoenzymatyczny ELISA</p>	<p>Spektrofotometryczne wykrywanie barwnych kompleksów antygen-przeciwciała</p>	<p>Pomiar zmian stężenia <i>Il-8</i> wyniku działania siły rozciągającej w badaniach nad kurczliwością macicy [110] Potwierdzenie wystąpienia przejścia decidualnego poprzez detekcje markerów [20]</p>
<p>Histochemia i immunohistochemia</p>	<p>Barwienie wybranych związków chemicznych</p>	<p>Analiza <i>In situ</i> aktywności ektonukleotydz w tkance z endometriozą [111] oraz nowotworem endometrium [112]</p>
<p>Cytometria przepływowa</p>	<p>Rejestracja promieniowania rozproszonego oraz fluorescencyjnego pochodzącego od przepływających przez dyszę komórek</p>	<p>Analiza markerów powierzchniowych komórek w celu określenia ich fenotypu [113]</p>

	Spektroskopia Ramana	Pomiar promieniowania rozproszenia Rayleigha oraz Ramana, związanego z drganiami własnymi cząsteczek	Analiza drgań grup charakterystycznych dla przemian chemicznych związanych z rozwojem endometriozy [114-115]
Analiza składu chemicznego	Mikrospektroskopia w podczerwieni	Analiza pochłoniętego przez cząsteczkę promieniowania IR o określonej częstotliwości, odpowiadającego przejściom do wzbudzonego stanu wibracyjnego	Analiza drgań grup charakterystycznych dla przemian chemicznych związanych z rozwojem endometriozy [115]
Pomiar adhezji i właściwości mechanicznych	Mikroskopia sił atomowych (AFM)	Analiza oddziaływań pomiędzy ostrzem pomiarowym a próbką	Analiza zmian modułu Younga i adhezji w wyniku decidualizacji [20] Pomiar oddziaływania pomiędzy komórkami trofoblasty i nabłonka endometrium [53]

4.1. Obrazowanie

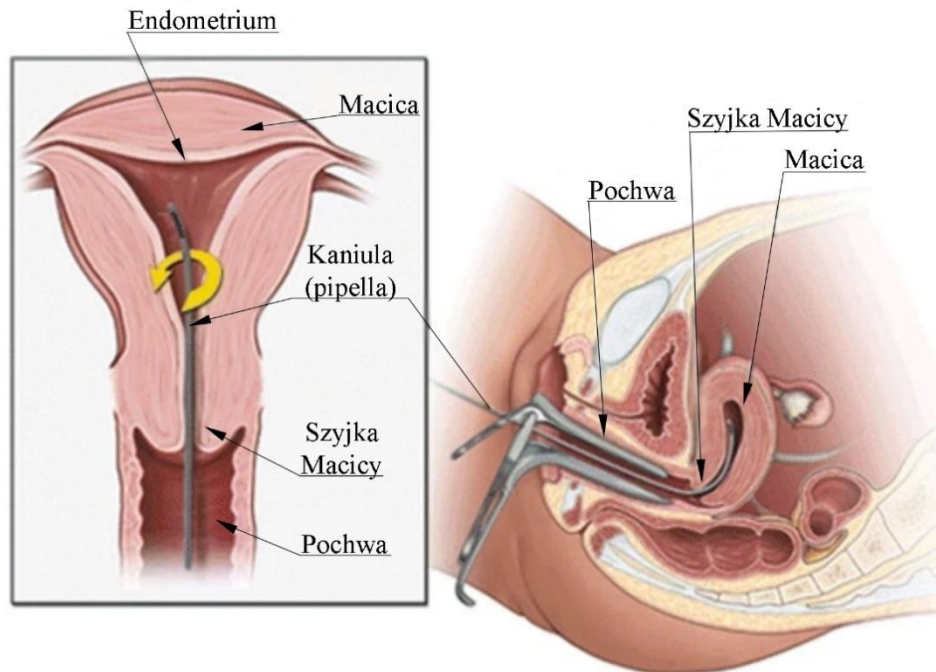
Jedną z podstawowych technik wykorzystywanych w diagnostyce ginekologicznej jest ultrasonografia, która poprzez zastosowanie ultradźwięków pozwala na uzyskanie informacji o strukturze organów i tkanek. Stosowanie USG zostało zapoczątkowane w latach 50. XX w. i wykorzystane po raz pierwszy do zobrazowania pęcherza moczowego oraz nerek. Zasada działania ultrasonografu oparta jest o zjawisko impedancji akustycznej, czyli oporu jaki ośrodek stawia rozchodzącej się fali dźwiękowej. Fala ulega ponadto odbiciu, załamaniu i ugięciu, które zależne są od kąta padania, długości fali, oraz nierówności badanej struktury. Narządy posiadają

charakterystyczny dla nich wzorzec echa (echogeniczności), a zmiany tych wzorców sugerują rozwój choroby [116]. USG, jako technika bezpieczna i nieinwazyjna, znajduje zastosowanie w kontrolnych badaniach ginekologicznych, ale także pozwala na zaobserwowanie zmian patologicznych, takich jak nieprawidłowa budowa narządów lub lokalizacji wielkości i unaczynienia zmian nowotworowych w obrębie miednicy mniejszej [15]. USG umożliwia ocenę warstwy endometrium, jej grubości oraz echogeniczność, zmieniającej się fizjologicznie w czasie cyklu, ale również w wyniku leczenia hormonalnego, oraz w związku z rozwojem chorób w obrębie endometrium, m.in. adenomiozy [97], polipów czy też nowotworów [97-98].

Jednoznaczna diagnostyka zmian w obrębie macicy nie jest możliwa przy zastosowaniu wyłącznie ultrasonografii. Często konieczne jest pobranie fragmentu tkanki, w celu przeprowadzenia badania histopatologicznego, pozwalającego na określenie charakteru obserwowanych zmian patologicznych, na podstawie oceny mikrostruktury. Pobranie materiału do badania odbywa się na drodze biopsji aspiracyjnej, biopsji podczas histeroskopii lub w wyniku łyżeczkowania. Biopsja aspiracyjna, tzw. Pipella (Rys. 7), jest najmniej inwazyjną metodą pobrania wycinka, polegającą na umieszczeniu polipropylenowej rurki wewnątrz jamy macicy, a następnie zassaniu fragmentu endometrium poprzez wytworzenie podciśnienia [117]. Histeroskopia należy do technik endoskopowych i umożliwia dokładną obserwację wnętrza jamy macicy poprzez umieszczenie w niej urządzenia optycznego wyposażonego w kamerę. Podczas zabiegu możliwe jest pobranie biopsji celowanej, z precyzyjnie wybranego obszaru. Biopsja podczas zabiegu histeroskopii jest obecnie standardowym zabiegiem w diagnostyce nowotworów endometrium [118]. Powszechne wprowadzenie do diagnostyki zabiegu histeroskopii zmniejszyło liczbę łyżeczkowań diagnostycznych polegających na złuszczeniu błony śluzowej ściany macicy, które należały do rutynowych zabiegów, pomimo niskiej wydajności i dużego ryzyka uzyskania fałszywego wyniku [118-119].

Ocena biopsji endometrium wymaga zastosowania mikroskopu optycznego, służącego do powiększenia obiektów niewidocznych gołym okiem. Tworzenie powiększonego obrazu możliwe jest dzięki zastosowaniu układu optycznego zbudowanego z zestawu soczewek. Do najważniejszych elementów mikroskopu optycznego należą obiektyw oraz okular. Zadaniem obiektywu jest utworzenie obrazu pośredniego, powstającego z promieni pochodzących od obserwowanego obiektu, który

może być oświetlony naturalnie lub z zastosowaniem sztucznego źródła światła. Obraz pośredni jest powiększany przez okular i w tej formie może być rejestrowany przez oko obserwatora lub kamerę [121].



Rysunek 7. Zasada pobierania wycinka techniką biopsji aspiracyjnej. Na podstawie: [120].

Zastosowanie mikroskopu optycznego w analizie histopatologicznej stanowi standard w diagnostyce patologii endometrium. Analiza ta umożliwia zaobserwowanie zarówno fizjologicznych, związanych z cyklem miesięcznym, przemian w endometrium, jak również na identyfikację zmian wywołanych leczeniem hormonalnym lub stanem zapalnym towarzyszącym endometriozie [99]. Ocena histopatologiczna pozwala na określenie charakteru przerostów (hiperplazji) widocznych w macicy i identyfikację zarówno łagodnych zmian takich jak polipy, jak również złośliwych gruczolakoraków atakujących gruczoły, oraz nowotworów endometrium tworzących się w warstwie nabłonkowej endometrium [99-103]. Do kryteriów ocenianych przez histopatologa należą: grubość endometrium i charakter ewentualnego pogrubienia, wzorce naczyniowe [100], architektura gruczołów, w szczególności rozmiar, kształt i regularność, stosunek liczby komórek zrębu do liczby gruczołów [100-103], obecność komórek plazmatycznych zdolnych do wytwarzania przeciwciał i namnażających się w następstwie wystąpienia stanu zapalnego [99]. Badanie histologiczne biopsji

endometrium stanowi również technikę diagnostyczną w badaniach nad niepłodnością [104].

Mikroskopia optyczna znajduje także zastosowanie w ocenie materiału cytologicznego. Cienkowarstwowa cytologia na podłożu płynnym (LBC, ang. *Liquid Based Cytology*) jest techniką umożliwiającą klasyfikację łagodnych, nietypowych oraz złośliwych komórek obecnych w rozmazie z szyjki macicy. Klasyfikacja komórek oparta jest o interpretację mikrofotografii wykonanych mikroskopem optycznym [105], z wykorzystaniem programu komputerowego, np. ImageJ [105,122]. Ocenie poddawane są cechy morfologiczne jąder komórkowych takie jak powierzchnia, średnia średnica oraz obwód jądra oraz odchylenie standardowe. Pozwala to na rozróżnienie komórek łagodnych i złośliwych. Niewątpliwą zaletą tej metody jest brak konieczności inwazyjnego pobrania próbki, jednak wprowadzenie tej techniki do grupy standardowych metod diagnostycznych wymaga dalszych badań, szczególnie w zakresie identyfikacji komórek nietypowych [105].

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. Charakterystyka komórek możliwa jest przy wykorzystaniu technik mikroskopowych, Transmisyjnej Mikroskopii Elektronowej oraz Skaningowej Mikroskopii Elektronowej (SEM, ang. scanning electron microscope). Mikroskopia elektronowa jest techniką umożliwiającą obrazowanie struktur o rozmiarze poniżej 1 μm , co możliwe jest ze względu na wysoką rozdzielczość, osiągającą 0,1 nm, zapewnioną przez małą długość fali wiązki elektronów wynoszącą nawet 1pm. Zarówno TEM jak i SEM wykorzystują silnie skupioną wiązkę elektronową (wiązka pierwotna), która zostaje skierowana na próbkę umieszczona w komorze próżniowej. Mikroskopy te różnią się natomiast rodzajem rejestrowanych elektronów, z czym wiąże się także inne umiejscowienie detektora. W przypadku TEM rejestrowane są elektrony przechodzące przez próbkę, natomiast w SEM do detektora trafiają elektrony powstałe w wyniku oddziaływania wiązki pierwotnej z próbką (wiązka wtórna). Różnice te mają wpływ na możliwości aplikacyjne tych mikroskopów i podczas gdy TEM jest wykorzystywany w badaniu struktury wewnętrznej materiału, SEM znajduje zastosowanie w analizie powierzchniowej [123].

Zastosowanie mikroskopii TEM oraz SEM w analizie komórek tworzących endometrium pozwoliło na wyznaczenie różnic w ich strukturze. Nabłonek endometrium jest zbudowany z komórek kolumnowych lub prostopadłościennych komórek, jednak analiza TEM pojedynczych komórek, potwierdzona pomiarem z wykorzystaniem SEM wykazała, że komórki nabłonkowe są płaskie, o wysokości jedynie ok 2-5 μm . Technika SEM pozwoliła także na zobrazowanie regularnych, dobrze zdefiniowanych krawędzi komórek. Obie techniki wykazały obecność mikrokosmków na powierzchni komórek nabłonkowych. Ponadto wykonanie mikrofotografii TEM pozwoliło na obserwację dwuwarstwowej struktury tworzonej przez komórki nabłonkowe. W przeciwieństwie do komórek nabłonkowych, komórki zrębu charakteryzują się nieregularną strukturą powierzchniową zobrazowaną przy pomocy SEM. Zarówno analiza TEM jak i SEM umożliwiły stwierdzenie braku mikrokosmków na powierzchni tego typu komórek. Obrazowanie TEM pozwoliło ponadto na zidentyfikowanie nieregularnych, w przeciwieństwie do nabłonka, połączeń międzykomórkowych, przypominających połączenia komórkowe śródbłonka. Dodatkowo techniki TEM oraz SEM dostarczyły dowodów na mezenchymalne pochodzenie komórek zrębu [106], co wiąże się ze zdolnością do różnicowania się do innych komórek [124].

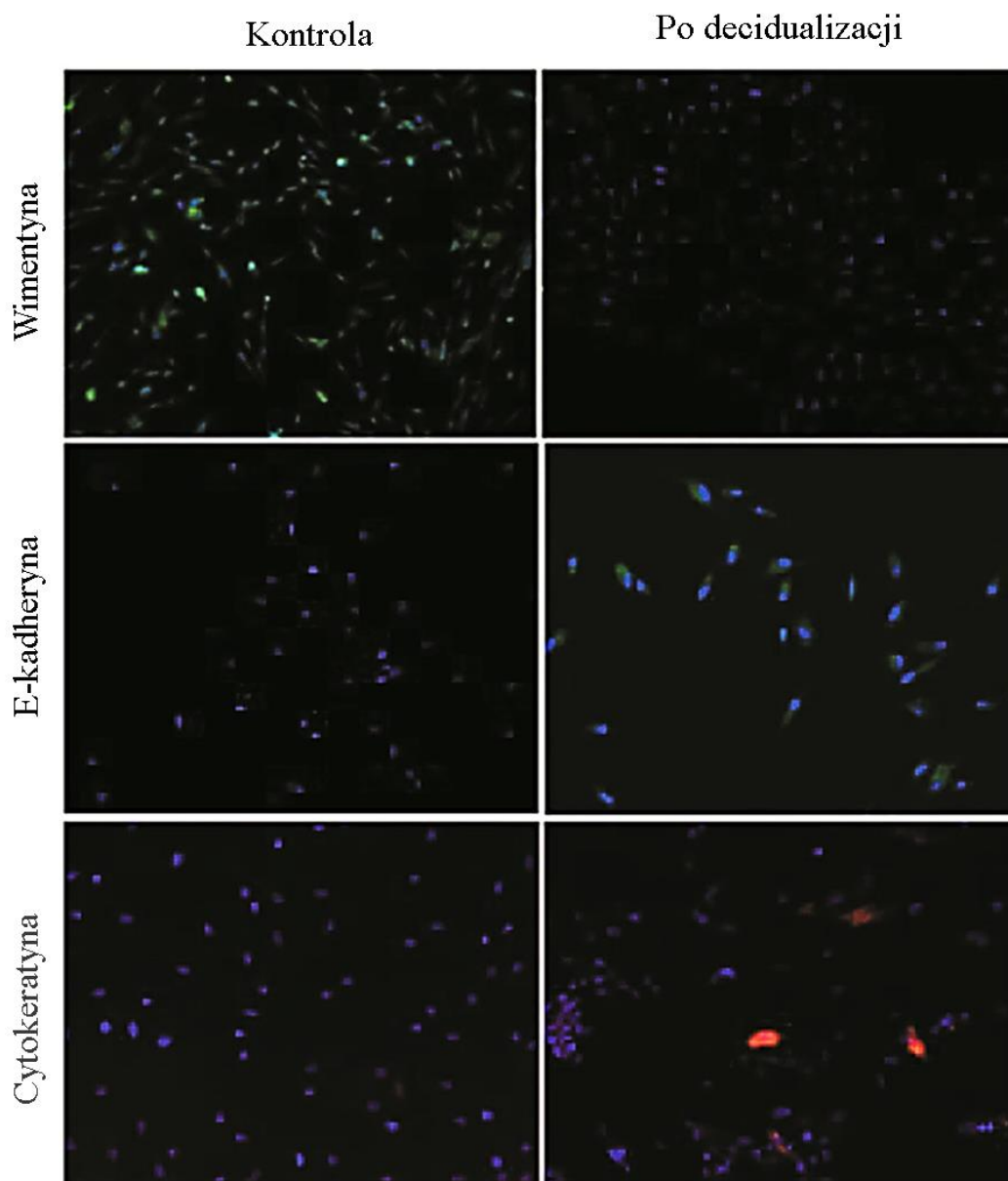
Jedną z głównych motywacji do analizowania komórek endometrium jest ich znaczenie w procesie implantacji zarodka, co potwierdzają badania dotyczące porównania ultrastruktury komórek pochodzących od pacjentek płodnych i z nawracającymi niepowodzeniami implantacji. Różnice opisane w rozdziale 3.2. niniejszej dysertacji zostały wykazane z zastosowaniem TEM [21]. Również SEM pozwala na uzyskanie mikrofotografii struktur występujących na powierzchni komórek, a więc pinopodów, mikrokosmków oraz rzęsek. SEM nie umożliwia jednak analizy struktury wewnętrznej tych wypustek, np. pod kątem obecności materiału wydzielniczego w pinopodach, na co pozwala technika TEM [107].

Zjawisko fluorescencji polega na emitowaniu światła w następstwie pochłonięcia promieniowania elektromagnetycznego z zakresu światła widzialnego, ultrafioletu lub podczerwieni. Do wyemitowania światła, zwykle o mniejszej energii, ale wyższej długości fali niż promieniowanie pochłonięte, dochodzi w przeciągu nanosekundy od absorpcji. Wybrane związki, najczęściej organiczne, posiadające zazwyczaj pierścień aromatyczny, wykazujące zdolność do fluorescencji własnej, określane są jako fluorofory. Ich właściwości związane są ze zdolnością do pochłonięcia energii

o określonej długości fali, a następnie emisji innej, charakterystycznej dla danej substancji fali. Część z fluoroforów wykazuje zdolność do przyłączania się do innych cząsteczek, np. białek. Określane wówczas jako znaczniki fluorescencyjne mogą służyć do detekcji wybranych elementów komórek, wizualizacji procesów fizjologicznych zachodzących w komórkach, a także obrazowania zmian patologicznych zachodzących w obrębie komórek. [125].

Jedną z odmian mikroskopii fluorescencyjnej jest mikroskopia konfokalna, charakteryzująca się wyższą rozdzielczością w porównaniu z tradycyjną mikroskopią fluorescencyjną. Trudnością, dotyczącą szczególnie grubszych próbek, obserwowaną w tradycyjnej mikroskopii fluorescencyjnej jest fakt, że wszystkie fluorofory obecne w próbce emitują promieniowanie przez cały czas ich naświetlania, w związku z czym do detektora trafia sygnał zarówno od obszarów, na których ma się skupiać obrazowanie, jak również z obszarów poza zakresem ostrości. Przewyciężenie tego ograniczenia możliwe jest poprzez zastosowanie lasera (CLSM, ang. *Confocal Laser Scanning Microscopy*) jako źródła światła oraz punktowego detektora, który jest jednak mniej czuły niż kamera. Innym podejściem jest zastosowanie wirującego dysku z dziurką (SDCM ang. *Spinning Disk Confocal Microscopy*) umożliwiającą ekspozycję pojedynczych punktów oraz rejestrowanie sygnału przy pomocy kamery, pozwalając tym samym na osiągnięcie wysokiej czułości przy jednoczesnym ograniczeniu zakłóceń. Zgromadzone w kolejnych punktach i płaszczyznach informacje pozwalają na utworzenie trójwymiarowego obrazu badanej próbki [126-127].

Mikroskopia konfokalna jest techniką wykorzystywaną najczęściej w celu uzupełnienia lub wyjaśnienia informacji uzyskanych innymi metodami. W przypadku analizy endometrium pozwala ona m.in. na potwierdzenie zachodzenia takich procesów jak decidualizacja. Jest to możliwe poprzez obserwację ekspresji białek, wimentyny, E-kadheryny oraz cytokeratyny (Rys. 8), stanowiących marker przejścia mezenchymalno-epitelialnego (MET ang. *Mesenchymal to Epithelial Transition*) zachodzącego podczas decidualizacji [20]. CLSM posłużył także do analizy skutków działania progesteronu podczas fazy cyklu zależnej od poziomu tego hormonu. Markerem wejścia komórki w tę fazę jest białko MUC-1, którego ekspresja może być obrazowana z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej [108].



Rysunek 8. Zmiany w ekspresji wimentyny, E-kadheryny oraz cytokeratyny w wyniku decidualizacji, zobrazowane przy pomocy mikroskopii konfokalnej. Po decidualizacji obniżeniu ulega ekspresja wimentyny, podczas gdy ekspresja E-kadheryny oraz cytokeratyny wzrasta. Na podstawie: [20].

Analiza zmian zachodzących w komórkach endometrium w wyniku rozwoju endometriozy jest nieustannie aspektem badań naukowców, ze względu na wciąż niewystarczające informacje do jednoznacznego opisanie jej przyczyn, a także opracowania metod leczenia. Mikroskopia konfokalna pozwoliła na zobrazowanie różnic w poziomie białek tworzących strukturę wewnętrzną w komórkach zdrowych oraz komórkach z endometriozą. W komórkach z endometriozą, w porównaniu ze zdrowymi komórkami, zaobserwowano zarówno wzrost ekspresji aktyny, białka będącego elementem cytoszkieletu komórki jak również winkuliny, przymocowującej włókna

aktywne do podstruktur komórki, a także odgrywającej ważną rolę w migracji komórek oraz tworzeniu połączeń międzykomórkowych [31].

Jedną z innych możliwości zastosowania technik mikroskopowych jest mikroskopia poklatkowa (ang. time-lapse microscopy). Technika ta polega na wykonaniu dużej liczby mikrofotografii w krótkich odstępach czasu. Otrzymany w ten sposób film poklatkowy pozwala na śledzenie w czasie mikroprocesów zachodzących w obrębie komórek. Ten wariant mikroskopii znajduje zastosowanie m.in. w analizie migracji i ruchliwości komórek. Umożliwia to obserwację zmian w mechanice komórek, związanych np. z rozwojem chorób takich jak endometrioza [31].

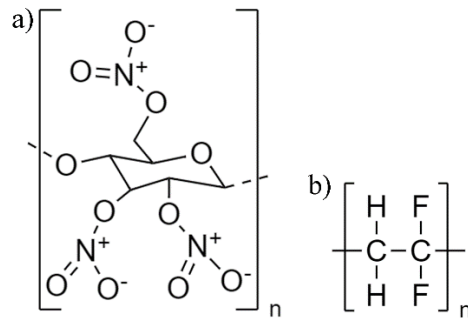
Mikroskopia sił atomowych, opisana szerzej w rozdziale 5., stanowi narzędzie coraz częściej wykorzystywane w celu uzupełnienia informacji uzyskanych innymi technikami mikroskopowymi. AFM pozwala na analizę zmian zachodzących w morfologii tkanek w nanoskali, poprzez pomiar wysokości oraz szorstkości próbki w różnych punktach badanej powierzchni. Zmiany te są niezwykle istotne, ponieważ towarzyszą przemianie powierzchni endometrium z niezdolnej do przyłączenia zarodka w tkankę receptywną. Zmiany ultrastrukturalne endometrium wiążą się m.in. z działaniem hormonów w tym progesteronu [108]. Zachodzące podczas decidualizacji zmiany morfologiczne w tkance wyściełającej macicę również mogą być analizowane z zastosowaniem AFM, który umożliwia obrazowanie topografii powierzchni i wykorzystanie otrzymanych danych do utworzenia profili wysokości i szorstkości powierzchni [20].

4.2. Analiza ekspresji genów i białek

Analiza ekspresji białek i genów towarzyszącej procesom zachodzącym w obrębie komórek stanowi ważne zagadnienie zarówno pod względem diagnostycznym jak również z uwagi na dostarczanie fundamentalnych informacji, pozwalających na potwierdzenie i właściwe zakwalifikowanie obserwowanych zjawisk. Analizy te umożliwiają śledzenie mechanizmów zjawisk z uwzględnieniem przyczyn (podłoże genetyczne, wpływ otoczenia) zachodzących zmian, a także analizę skutków integracji dwóch białek [128].

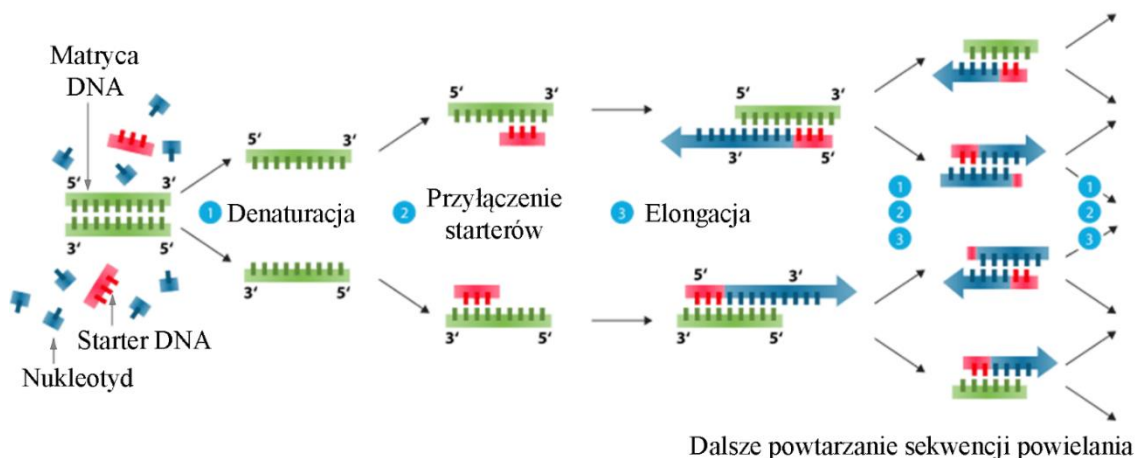
Powszechnie stosowaną w detekcji specyficznych białek techniką jest metoda Western Blot. Składa się ona zasadniczo z trzech etapów: elektroforetycznego rozdziału

mieszaniny białek na żelu poliakrylamidowym w oparciu o ich masę molową, elektroforetycznego przeniesienia wyizolowanych białek na nitrocelulozową lub utworzoną z polifluorku winylidenu (PVDF, ang. *polyvinylidene fluoride*) (Rys. 9) matrycę, a następnie detekcji białek z udziałem swoistych przeciwciał. Elektroforeza prowadzona jest najczęściej w warunkach denaturujących, zapewnionych poprzez obecność detergentu, który poprzez proces denaturacji nadaje wszystkim cząsteczkom jednakowy ładunek, uniezależniając rozdział od ładunku [128]. Technika Western blot, w połączeniu z innymi metodami, pozwala na kontrolę ekspresji m.in. białka MUC-1, niezbędnego podczas procesu implantacji zarodka w macicy. Analiza ta uzupełnia więc uzyskane przez zastosowanie mikroskopu sił atomowych oraz mikroskopu konfokalnego informacje o zmianach wywołanych poprzez działanie progesteronu [108]. Technika Western blot posłużyła także do wyjaśnienia zjawiska zmiany ruchliwości komórek u pacjentek z endometriozą. W tym wypadku analiza ekspresji enzymu GTPazy wiążącego nukleotyd guanozyno-5'-trójfosforan (GTP), w połączeniu z obserwacją w oparciu o mikroskopię poklatkową, pozwoliła na zaobserwowanie wzrostu ruchliwości komórek od pacjentek z endometriozą i powiązanie tego faktu ze wzrostem stężenia GTPazy. Znaczenie GTPazy dla zmian w ruchliwości komórek jest związane z udziałem tego enzymu w procesie polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny [31]. Monitorowanie ekspresji białek okazuje się także przydatne w analizie zachowania tkanki podczas jej mechanicznego rozciągania. Macica jest organem, którego zdolność do kurczliwości jest kluczową cechą umożliwiającą usuwanie złuszczonego się w czasie cyklu nabłonka, pełniącą istotną funkcję podczas zapłodnienia, umożliwiającą transport nasienia w drogach rodnych oraz zarodka w macicy [129], a także pozwalającą na kontrolę postępu porodu poprzez wywoływanie skracania i rozwierania szyjki macicy [130]. Rozciąganie komórek zrębu endometrium zostało zasymulowane z zastosowaniem urządzenia próżniowego. W wyniku rozciągania zaobserwowano wzrost fosforylacji kinaz ERK1/2 (kinazy regulowane sygnałem zewnątrzkomórkowym, (ang. *extracellular signaling- regulated kinase*), szczególnie znaczący w 5 minucie rozciągania. Fosforylację białek w tym eksperymencie mierzono z pomocą techniki Western blot. Zgodnie z przeprowadzonymi obserwacjami ERK stanowi czynnik pobudzający wydzielanie białka z grupy chemokin, Interleukiny 8 (IL-8), której ekspresja jest szczególnie wyraźna w czasie menstruacji [110].



Rysunek 9. Wzory strukturalne a) nitrocelulozy oraz b) polifluorku winylidenu.

Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR, ang. *Polymerase chain reaction*) jest techniką służącą do identyfikacji łańcuchów DNA w oparciu o śladową ilość DNA w próbce. Technika ta opiera się o amplifikację czyli powielanie wybranych fragmentów DNA, w celu uzyskania wystarczającej do analizy liczby kopii (Rys. 10). Pierwszym etapem metody PCR jest izolacja materiału DNA z próbki, którą mogą stanowić zarówno żywe jak i martwe tkanki, w tym krew, fragmenty skóry lub organów, czy też włosów, a także wydzieliny takie jak np. ślina lub mocz. Matryca, czyli fragment łańcucha polinukleotydowego, który ma zostać poddany powielaniu, musi być oczyszczona z białek i inhibitorów enzymów w celu uzyskania wysokocząsteczkowego DNA. Kluczowym etapem reakcji PCR jest synteza DNA katalizowana przez enzym, polimerazę DNA, i polegająca na wbudowaniu do nici matrycy nukleotydów, zgodnie z zasadą komplementarności. Powielana sekwencja jest uzależniona od starterów-krótkich, jednoniciowych łańcuchów DNA znajdujących się w mieszaninie reakcyjnej, a dobranych do badanej sekwencji również w oparciu o zasadę komplementarności.



Rysunek 10. Schemat ideowy techniki PCR. Na podstawie: [133].

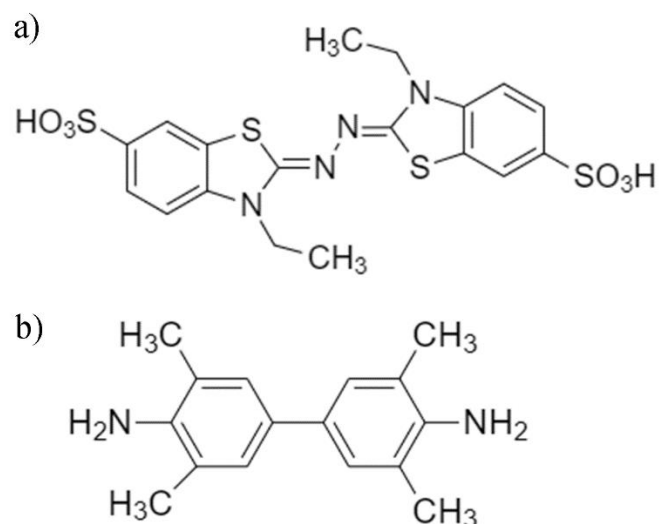
Startery przyłączają się na obu końcach łańcuchów, które mają być przedmiotem powielania. Kolejne etapy reakcji PCR definiowane są poprzez zmiany temperatury, kontrolowane dzięki prowadzeniu reakcji w termocyklerach, pozwalających na zmianę temperatur w ściśle określonych sekwencjach. W czasie reakcji łańcuchowej polimerazy następuje cykliczne, najczęściej 30-krotne, powtarzanie denaturacji, przyłączania starterów oraz elongacji. Denaturacja jest procesem prowadzonym w 95°C, podczas którego pękają wiązania wodorowe odpowiedzialne za stabilizację podwójnej helisy DNA, w wyniku czego powstają dwa pojedyncze łańcuchy. Kolejny etap zachodzi w niższej temperaturze, dobranej odpowiednio do rodzaju starterów, które mają zostać przyłączone do matrycy i kończy się powstaniem kompleksów starter-matryca. Elongacja, przebiegająca w temperaturze 72 °C przy udziale polimerazy, polega na wybudowaniu komplementarnych nukleotydów i stanowi właściwą syntezę DNA [131-132].

Odmianą PCR jest reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (RT-PCR ang. *reverse-transcription polymerase chain reaction*). W metodzie tej wykorzystuje się enzym, odwrotną transkryptazę, który pozwala na przepisanie jednoniciowego RNA matrycę, na dwuniciowe cDNA (komplementarne do RNA) w procesie odwrotnej transkrypcji. Kolejne etapy przebiegają jak w technice PCR. Modyfikacja techniki PCR pozwala na analizowanie niewielkich ilości RNA w próbce [132]. Technika ta znajduje zastosowanie w porównywaniu ekspresji mRNA *WT1* u kobiet zdrowych i z PCOS. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano obniżoną, w porównaniu ze zdrowymi kobietami, ekspresję genu *WT1* w czasie okna implantacyjnego u pacjentek z zespołem policystycznych jajników. Zaburzenia poziomu *WT1* regulowanego poprzez hormony płciowe, stanowią ważny czynnik mogący przyczyniać się do problemów z receptywnością [109]. RT-PCR została wykorzystana także w analizie zmian w ekspresji genu *MUC-1* w wyniku działania progesteronu. Zaobserwowano, że poziom *MUC-1* wzrasta analogicznie do białka MUC-1, którego poziom analizowano techniką Western blot [108].

Inny wariant techniki PCR, ilościowa analiza PCR w czasie rzeczywistym (*real-time PCR*, lub qPCR, ang. *quantitative polymerase chain reaction*) polega na monitorowaniu, w czasie rzeczywistym, przyrostu kopi analizowanego fragmentu, w oparciu o pomiary z zastosowaniem technik fluorescencyjnych. W tym celu wykorzystywane jest znakowanie fluoroforami reagentów, najczęściej fragmentów DNA,

których poziom fluorescencji zmniejsza się po przyłączeniu do nici DNA, a także może różnić się w zależności od przyłączenia do jedno- lub dwuniciowego DNA [134]. qPCR znajduje zastosowanie w pomiarze ekspresji genów w trakcie przebiegu procesów biologicznych, podczas których istotne są ilościowe zmiany poziomów genów na różnych ich etapach. Przykładem zastosowania tej techniki jest analiza poziomu genu *EGFR*, którego zmiany znacząco różnią się podczas trwania decidualizacji oraz gdy proces ten nie zostaje zainicjowany [20]. PCR w czasie rzeczywistym pozwolił także na monitorowanie ekspresji mRNA *Il-8*, która wzrasta podczas mechanicznego rozciągania komórek endometrium [110].

Powszechnie stosowana w diagnostyce technika ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*) umożliwia wykrywanie białek, w szczególności antygenów o charakterze białkowych oraz przeciwciał. W metodzie tej detekcja zachodzi w oparciu o wytworzenie barwnego kompleksu pomiędzy antygenem i przeciwciałem wraz ze skoniugowanym z nim enzymem. Zmiana barwy, której natężenie jest związane bezpośrednio z liczbą tworzących się wiązań pomiędzy antygenem i przeciwciałem, jest mierzona spektrofotometrycznie i umożliwia zarówno jakościowe jak i ilościowe oznaczenie białek w badanej próbce. Testy prowadzone są w układzie dwufazowym, z udziałem fazy stałej stanowiącej nośnik do którego wiązany jest oznaczany antygen lub przeciwciało. Najczęściej jako nośnik wykorzystywane są płytki wielodołkowe, a badane związki są immobilizowane w dołkach, do których dodawane są kolejne roztwory reagentów. W przypadku wykrywania antygenów, w pierwszej kolejności do dołka dodawany jest roztwór zawierający przeciwciała, natomiast podczas oznaczania przeciwciał, roztwór z antygenami. Przed dodaniem kolejnego roztworu, zawierającego znakowane enzymem przeciwciała, konieczne jest usunięcie nieprzereagowanych reagentów poprzez przepłukanie środowiska reakcji. Niezwiązane przeciwciała są usuwane podczas kolejnego przemywania środowiska reakcji. Następnie do dołka dodawany jest substrat, najczęściej kwas 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy) (ABTS) lub 3,3',5,5'-Tetrametylobenzzydina (Rys. 11), który reaguje z enzymem związanym z odpowiednim przeciwciałem, czego skutkiem jest zmiana barwy [135-136].



Rysunek 11. Wzory strukturalne a) kwasu 2,2'-azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowego oraz b) 3,3',5,5'-Tetrametylobenzydyny.

W badaniach nad komórkami endometrium test ELISA znajduje zastosowanie w oznaczaniu białek w medium pochodzonym. Przykładem wykorzystania tej techniki immunoenzymatycznej jest wykrywanie białka Il-8 podczas obserwacji rozciągania komórek w badaniach nad kurczliwością endometrium. W wyniku przeprowadzonych badań zaobserwowano stopniowy wzrost ekspresji Il-8 w czasie rozciągania komórek. Obserwacje te pozwalają na stwierdzenie, że energiczne skurcze macicy w czasie miesiączki prowadzą do regulacji fizjologii macicy poprzez wydzielanie Il-8 przez komórki endometrium. Jednocześnie wyniki tych badań sugerują możliwy związek ruchów macicy z rozwojem endometriozy, w patogenezie której również uczestniczy Il-8 [110]. Test ELISA wykorzystano także do detekcji markerów decidualizacji, prolaktyny oraz IGFBP-1, których stężenie stopniowo wzrasta po zainicjowaniu decidualizacji. Technika ta pozwoliła więc na kontrolę oraz potwierdzenie wystąpienia przejścia decidualnego [20].

Inną grupą technik opartych o barwienie wybranych związków chemicznych obecnych w tkance, możliwych do zobrazowania przy użyciu mikroskopu, są techniki histochemiczne i immunohistochemiczne. Pierwszym typem oznaczeń histochemicznych jest barwienie oparte o reakcję wybranych składników komórki np. cytoplazmy lub tkanki o określonych właściwościach np. tkanki łącznej z barwnikiem, w celu określenia charakteru badanych tkanek. Drugim typem tych reakcji jest oznaczanie produktów aktywności enzymu, poprzez dodatek odpowiedniego dla niego substratu. Produkt tej reakcji jest uwidaczniany przy pomocy barwnika [137]. Barwienie

immunohistochemiczne jest wykorzystywane do wykrywania antygenów poprzez wiązanie ich z odpowiednim przeciwciałem wraz z związanym z nim enzymem, umożliwiającym uzyskanie barwnej odpowiedzi. Techniki te pozwalają nie tylko na detekcję wybranych substancji, ale także określenie ich lokalizacji w obrębie komórki lub tkanki [137-138]. W praktyce techniki immunohistochemiczne mogą być wykorzystane np. do śledzenia aktywności ectonukleotydaz CD39 oraz CD73 *in situ* w tkance endometrium. Ectonukleotydazy są enzymami, które odpowiadają za regulację poziomu zewnątrzkomórkowego adenozylo-5'-trifosforanu (ATP), będącego nośnikiem energii. Wykazano, że aktywność tych enzymów zmniejsza się u pacjentek z endometriozą, szczególnie w przypadku najcięższego podtypu tej choroby [111]. Z kolei w badaniach dotyczących nowotworów endometrium stwierdzono wysokie poziomy obydwu enzymów, zwłaszcza zwiększoną ekspresję nukleotydazy CD39 w przypadku nowotworu surowiczego o wyższym stopniu zaawansowania [112].

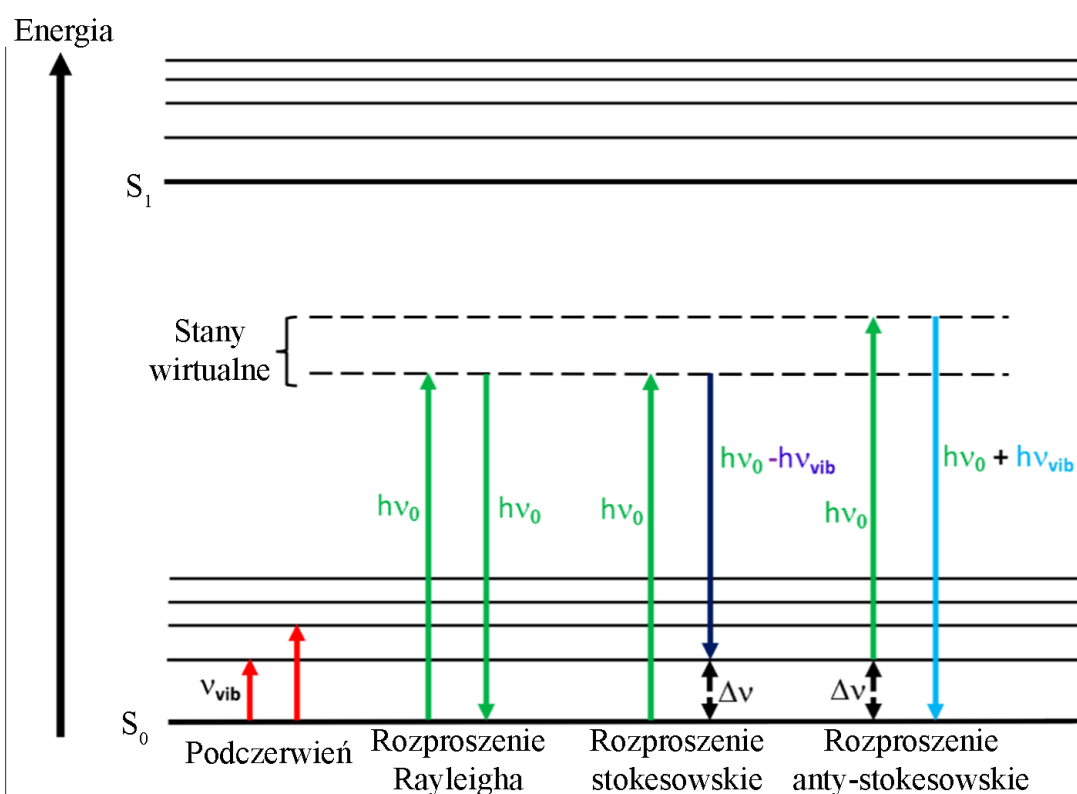
Cytometria przepływowa jest techniką służącą przede wszystkim do jakościowej i ilościowej oceny komórek w oparciu o analizę światła rozproszonego przez komórki. Pomiar w cytometrze przepływowym polega na wprowadzeniu zawiesiny komórek do zwężającego się kanału, przez który, na skutek ogniskowania hydrodynamicznego, komórki przepływają ze stałą prędkością. Przepływające komórki zostają oświetlone wiązką laserową, a rozproszone na nich promieniowanie jest rejestrowane przez fotodetektory. Ważnych danych dostarcza także pomiar fluorescencji związanej z naturalnie występującymi fluoroforami lub użytymi do znakowania barwnikami fluorescencyjnymi. Barwienie, podobnie jak w przypadku technik histochemicznych oraz ELISA, umożliwia oznaczenie antygenów poprzez przyłączenie do nich znakowanych fluorescencyjnie przeciwciał. Opracowanie otrzymanych w czasie pomiaru widm pozwala na identyfikację związków znajdujących się na powierzchni komórek [139], np. w celu identyfikacji markerów powierzchniowych świadczących o fenotypie komórek. W przypadku analizy komórek endometrium uzyskano w ten sposób informacje o obecności markerów występujących w komórkach macierzystych oraz szpiku kostnym. Zaobserwowano również, że komórki zrębu wykazują zdolność do różnicowania się do komórek macierzystych. Poczynione obserwacje są kolejnym krokiem do zrozumienia patogenezy chorób endometrium, a także stanowią podstawę do zastosowania macierzystych komórek endometrium w inżynierii tkankowej [113].

4.3. Analiza składu chemicznego

Identyfikacja związków chemicznych obecnych w próbce możliwa jest także poprzez analizę występujących w nich wiązań i grup funkcyjnych w oparciu o pomiar oscylacji wybranych cząstek. W tym celu można zastosować spektroskopię oscylacyjną, do której zalicza się spektroskopię Ramana oraz spektroskopię w podczerwieni (IR, ang. *infrared spectroscopy*). Techniki te są komplementarne co oznacza, że drgania, które są aktywne w podczerwieni nie dają sygnału w widmie Ramana i odwrotnie. Pełna charakterystyka związków wymaga więc często łącznego stosowania obydwu tych metod. Spektroskopia oscylacyjna wykorzystuje zjawisko drgań atomów w cząsteczce, wśród których wyróżnia się drgania rozciągające i zginające. Energia cząsteczek związana z drganiami własnymi cząstki, stanowi, obok energii związanej z ruchem elektronów oraz energii wynikającej z rotacji cząsteczki w całości, składową całkowitej energii cząsteczki. Zarówno spektroskopia Ramana jak również spektroskopia w podczerwieni wykorzystują obserwację przejść oscylacyjnych wywołanych oświetleniem próbki promieniowaniem elektromagnetycznym o określonej długości fali. Absorpcja promieniowania możliwa jest tylko gdy zostanie spełniona reguła wyboru, co oznacza, że fotony promieniowania padającego muszą posiadać odpowiednią energię. Metody te różnią się pochodzeniem rejestrowanego w nich widma, a także energią, którą muszą posiadać padające fotony.

W przypadku techniki Ramana widmo ma swoje źródło w polaryzacji elektronowej, będącej odpowiedzią na oddziaływanie z elektryczną składową promieniowania ultrafioletowego (UV, ang. *ultraviolet*, $\lambda=10-400$ nm) lub bliskiej podczerwieni (near IR, ang. *near infrared*, $\lambda=700-1000$ nm). Polaryzowalność jest parametrem, który określa w jakim stopniu pole elektryczne może zmienić chmurę elektronową, a co za tym idzie, orbital molekularny cząsteczki. Zjawisko Ramana polega na oddziaływaniu elektrycznej składowej promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczką będącą zbiorem dodatnich i ujemnych ładunków elektrycznych, co prowadzi do indukcji momentu dipolowego. Drgania wywołane obecnością momentu dipolowego przyczyniają się do emisji trzech typów promieniowania: rozproszenia Rayleigha o częstości równej częstości promieniowania padającego oraz stokesowskiego i antystokesowskiego rozproszenia Ramana, których częstość jest odpowiednio mniejsza lub większa o wartość częstości drgania przejścia wibracyjnego od częstości promieniowania padającego (Rys. 12). Promieniowanie stokesowskie jest emitowane

przez cząsteczkę, która początkowo znajduje się w podstawowym stanie wibracyjnym, a po emisji promieniowania wraca do wzbudzonego stanu rotacyjnego. Odwrotna sytuacja ma miejsce w przypadku promieniowania antystokesowskiego, w którym z pierwotnie wzbudzonego stanu rotacyjnego, w wyniku rozproszenia cząsteczka wraca do stanu podstawowego [140]. Różnica pomiędzy rozproszeniem Rayleigha i Ramana nazywana jest przesunięciem Ramana. Wielkość ta odpowiada częstotliwości drgań w analizowanej cząsteczce, która w przypadku każdego wiązania jest inna, co pozwala na identyfikację występujących w niej wiązań [114].



Rysunek 12. Diagram Jabłońskiego. Wykres energii przedstawia przejścia między poziomami energetycznymi towarzyszące absorpcji promieniowania w podczerwieni oraz polaryzacji elektronowej. S_0 i S_1 - podstawowy i wzbudzony stan energetyczny, ν_{vib} - częstotliwość wibracji, h - Stała Planca, $h\nu_0$ - energia początkowa lasera, $h\nu_{vib}$ - energia wibracyjna, $\Delta\nu$ - przesunięcie Ramana. Na podstawie: [141].

W spektroskopii w podczerwieni próbka jest oświetlana polichromatycznym (obejmującym szeroki zakres częstotliwości) promieniowaniem podczerwonym ($\lambda=700$ nm- 1 mm). Absorpcja promieniowania przez cząsteczkę możliwa jest gdy spełniona jest reguła wyboru, czyli energia promieniowania odpowiada energii niezbędnej do przejścia cząsteczki z wibracyjnego stanu podstawowego do stanu wzbudzonego, a więc różnicy

energii wibracyjnych pomiędzy poziomami energetycznymi. Dodatkowo, podobnie jak w przypadku techniki Ramana, w spektroskopii IR widoczne w widmie są przejścia, którym towarzyszy zmiana momentu dipolowego związana z drganiami. Promieniowanie, które nie zostało pochłonięte przez próbkę trafia do detektora. We współczesnych urządzeniach doprowadza się interferencji tego zarejestrowanego promieniowania z wiązką z tego samego źródła, które nie przeszło przez próbkę. Otrzymane widmo w postaci intensywności w funkcji długości przekształca się stosując matematyczną operację, transformatę Fouriera, w celu otrzymania widma w postaci intensywności w funkcji częstotliwości (liczby falowej). Technika ta nosi nazwę spektrofotometrii w podczerwieni z transformacją fourierowską (FTIR, ang. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) [140].

Spektroskopia ramanowska znajduje zastosowanie jako nieinwazyjna technika służąca do oznaczania biomarkerów, charakterystyki struktur chemicznych, a także monitorowania przebiegu reakcji w komórkach i tkankach. Można ją wykorzystać jako narzędzie do oznaczania składu chemicznego próbek, np. krwi w diagnostyce endometriozy, bez konieczności wykonywania laparoskopii stanowiącej obecnie standardową procedurę medyczną. Analiza widma Ramana w zakresie $1729\text{--}790\text{ cm}^{-1}$ pozwoliła na opisanie pasm mogących stanowić marker endometriozy. Wykorzystano w tym celu metodę analizy składowych głównych (PCA, ang. *Principal Component Analysis*) pozwalającą na redukcję liczby zmiennych, w celu wskazania zmiennych mających największy wpływ na poszczególne składniki główne. Zmiany w widmie, które uznano za potencjalnie charakterystyczne dla endometriozy, zaobserwowano przy pasmach $1156\text{ i }1520\text{ cm}^{-1}$, przypisanych odpowiednio drganiom wiązań C-C oraz C=C beta karotenu. Mogą być one powiązane ze zmianami metabolizmu kwasu retinowego u pacjentek z endometriozą [114]. W badaniach nad endometriozą wykorzystano także łączenie techniki spektroskopii Ramana z IR wraz z techniką analizy danych PCA. Przeprowadzono w ten sposób analizę grup polarnych (IR) oraz polaryzowalnych (spektroskopia Ramana) występujących w komórkach Granulosa, które regulują rozwój oocytu dającego początek komórce jajowej. Próbkę otrzymano z obydwu jajników pacjentek z endometriozą zlokalizowaną w obrębie jednego jajnika oraz kobiet ze zdiagnozowaną niepłodnością o różnym podłożu (grupa kontrolna). Różnice w widmach pochodzących od komórek z jajnika objętego endometriozą oraz z jajników pacjentek niepłodnych zaobserwowano w całym zakresie liczb falowych. Szczególnie istotne

różnice dotyczyły wzrostu intensywności drgań rozciągających grup =CH i ugrupowań estrowych C=O oraz spadku intensywności drgań grup CH₂ w jajnikach objętych endometriozą w stosunku do grupy kontrolnej, co przypisano zachodzącemu w jajnikach kobiet z endometriozą utlenianiu (peroksydacji) lipidów. Nie stwierdzono natomiast różnic w widmach pochodzących od komórek z jajnika z endometriozą i drugiego, teoretycznie zdrowego jajnika, co może sugerować, że zaburzenia peroksydacji lipidów obejmują obszar większy niż zmiany chorobowe zdiagnozowane standardowymi metodami [115].

4.4. Analiza oddziaływań międzykomórkowych i komórka-podłoże

Niezwykle ważnym aspektem badań jest pomiar adhezji pomiędzy komórkami, a także komórkami i podłożem, która jest kluczowa w procesie implantacji. Zaburzenia adhezji towarzyszą często różnym chorobom, w tym endometriozie [142]. Do technik umożliwiających tego typu pomiary należy mikroskopia sił atomowych, która pozwala na pomiar właściwości mechanicznych. Możliwości AFM wykorzystano do wyznaczenia adhezji oraz modułu Younga podczas decidualizacji. Chociaż pomiary te nie wykazały zasadniczych, będących następstwem decidualizacji zmian w elastyczności i adhezji, w przypadku komórek po decidualizacji zaobserwowano wzrost deformacji, który wskazuje na zmięczenie komórek [20]. Pomiar siły oddziaływań międzykomórkowych z wykorzystaniem AFM, a w przypadku analizy zjawiska adhezji podczas procesu implantacji komórek trofoblasty oraz nabłonka endometrium, jest osiągalny dzięki możliwości funkcjonalizacji ostrza pomiarowego komórkami trofoblasty. Przebadano dwie linie komórkowe nabłonka macicy, RL95-2 oraz HEC-1-A. W przypadku linii RL95-2 stwierdzono zdolność do przyłączania komórek trofoblasty, natomiast linia HEC-1-A tej zdolności nie wykazywała. Obserwacja ta wskazuje możliwy kierunek dalszych badań dotyczących mechanizmu implantacji [53].

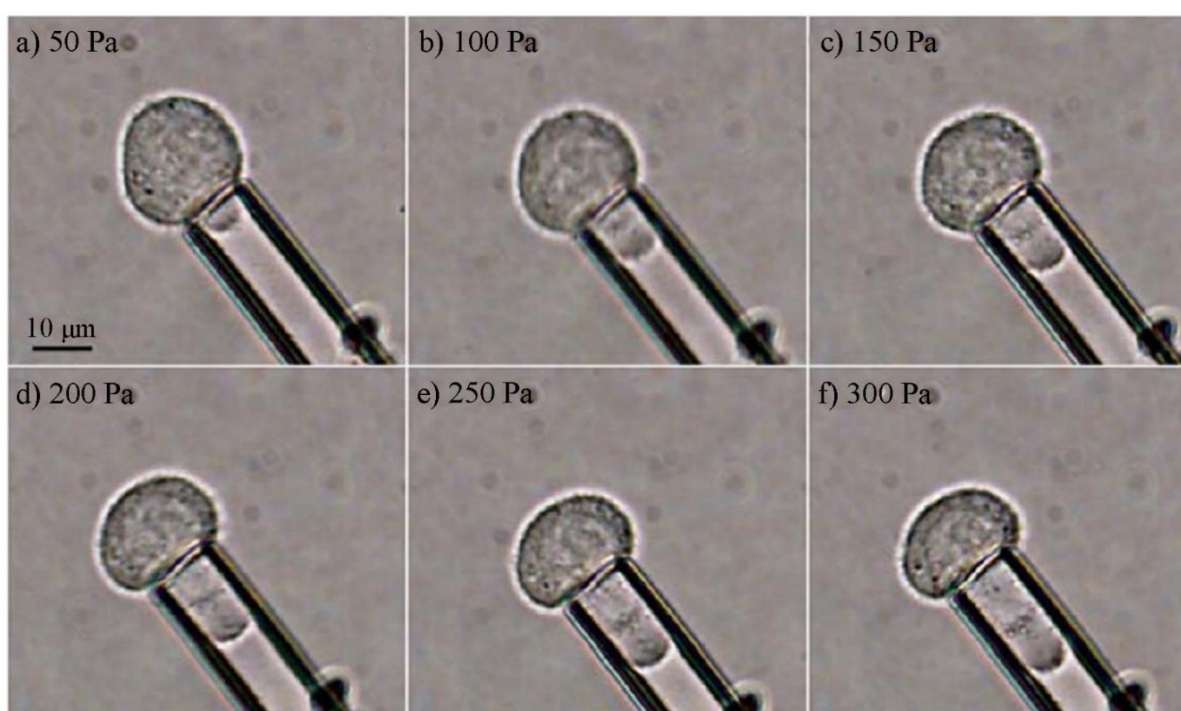
4.5. Techniki o potencjalnym zastosowaniu w badaniach nad endometrium

Oprócz metod najczęściej wykorzystywanych w badaniach nad endometrium oraz tych, których zastosowanie jest rozwijane, istnieje szereg technik, których zastosowanie do analizy endometrium nie zostało dotąd opisane (Tabela 2). W oparciu o publikacje dotyczące innych materiałów biologicznych można przypuszczać, że ich potencjał i możliwość dostarczenia kluczowych informacji o właściwościach endometrium są duże.

Tabela 2. Wybrane metody analizy komórek wraz z przykładami zastosowania.

Przeznaczenie	Technika	Podstawa fizyczna	Przykład zastosowania
Pomiar właściwości mechanicznych	Zasysanie mikropipetą	Deformacja komórki poprzez zasysanie do mikrokapilary	Pomiar wartości modułu Younga komórek raka prostaty [143] Opracowanie metody pomiaru adhezji komórek śródbłonka do powierzchni [144]
	Szczypce optyczne	Zastosowanie wiązki laserowej do wychwytu i manipulacji obiektów biologicznych	Analiza wpływu sąsiadujących komórek na właściwości mechaniczne komórek raka piersi [145] Obserwacja oddziaływań międzykomórkowych na przykładzie nabłonkowych komórek zarodka [146]
Poprawa rozdzielczości spektroskopii Ramana	Mikroskopia sił atomowych (AFM)	Analiza oddziaływań pomiędzy ostrzem pomiarowym a próbką	Pomiar elastyczności różnych typów komórek [147] Przyporządkowanie poszczególnym punktom powierzchni odpowiednich właściwości mechanicznych komórek [24] i tkanek [26] Ocena stadium nowotworu w oparciu o pomiary elastyczności i lepkości [148]
	Spektroskopia Ramana wzmocniona na ostrzu sondy skanującej (TERS)	Wzmocnienie sygnału ramanowskiego poprzez zastosowanie ostrza pomiarowego AFM pokrytego metalem (Ag, Au, Pt)	Przyporządkowanie poszczególnym punktom powierzchni odpowiedniego składu chemicznego np. detekcja peptydów i polisacharydów na powierzchni bakterii [149] lub analiza powierzchni lipidowej modyfikowanej białkiem [150]

Właściwości mechaniczne komórek, a co za tym idzie, również tworzonych przez nie tkanek stanowią istotną cechę warunkującą pełnienie odpowiednich funkcji w organizmie. Podobnie w przypadku komórek endometrium odgrywają one ważną rolę, co potwierdzają m.in. badania dotyczące zmian w zdolności komórek do migracji w rozwoju endometriozy [31], oraz obserwacje zaburzeń kurczliwości macicy [110]. Wśród technik, które można zastosować w analizie właściwości mechanicznych, ale także pomiaru adhezji można wyróżnić zasysanie mikropipetą (MPA, ang. *micropipette aspiration*), pomiar z wykorzystaniem szczypiec optycznych (OT, ang. *optical tweezers*), jak również mikroskopię sił atomowych (AFM).



Rysunek 13. Sekwencja fotografii typowych dla eksperymentu z użyciem mikropipety. Zdjęcia wykonane w odstępie 3-4 minut przedstawiają zasysanie komórki towarzyszące wzrostowi ciśnienia ssącego. Na podstawie: [143].

Mikropipeta używana do zasysania komórek jest mikrokapilarą o średnicy zwykle mniejszej od pojedynczej komórki. Pomiar następuje w wyniku wytworzenia siły ssącej, będącej następstwem jednostronnie wytworzonego podciśnienia [151] (Rys. 13). Zwiększanie ciśnienia powodującego zasysanie komórek do mikropipety skutkuje rozciągnięciem lub całkowitym wciągnięciem komórki do kapilary. Przedmiotem obserwacji jest deformacja komórki [143]. Ilościowe wyznaczenie parametrów mechanicznych komórki jest możliwe, gdy znane są właściwości mikropipety takie jak jej średnica, oraz inne parametry pomiaru, w tym siła zasysania, a zachowanie komórki

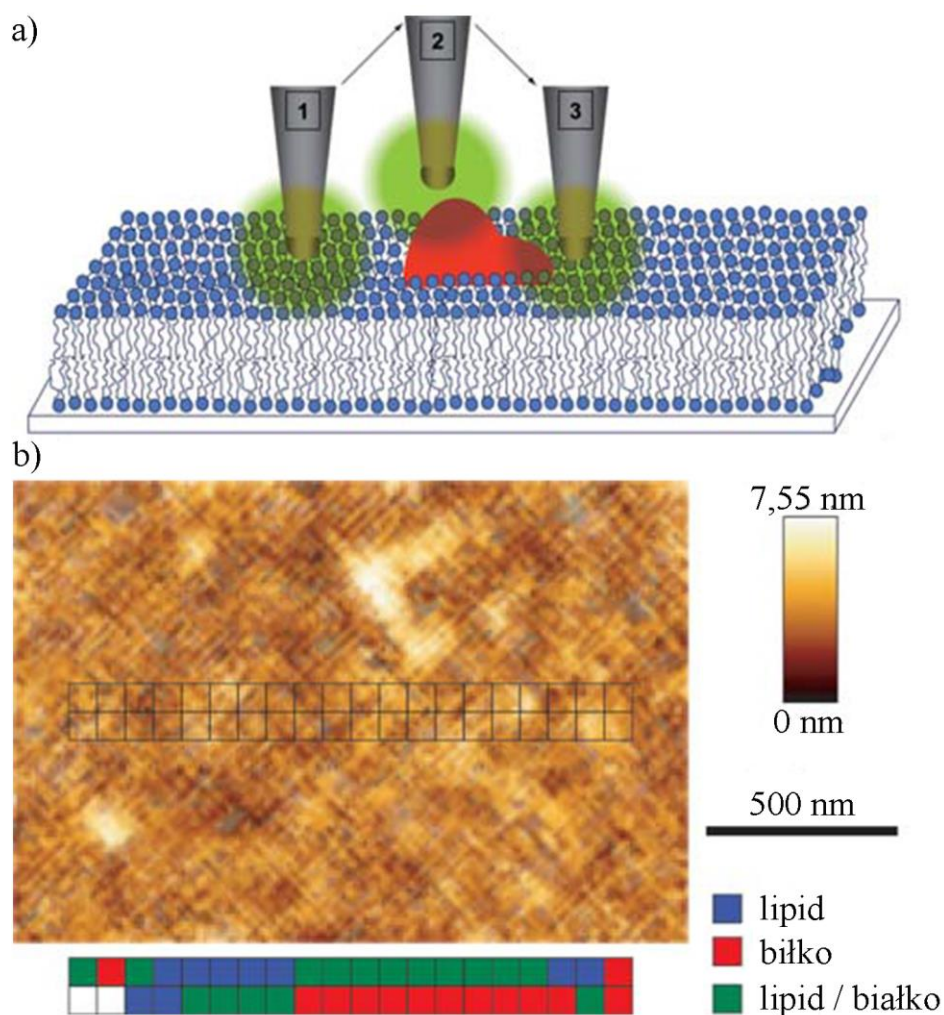
jest monitorowane przy użyciu mikroskopu [144]. Technika MPA pozwala na pomiar napięcia powierzchniowego błony komórkowej oraz elastyczności komórek [151], w postaci modułu Younga wyznaczonego np. dla komórek raka prostaty [143]. Przykładem zastosowania metody MPA jest również pomiar adhezji komórek śródbłonna aorty bydłowej do podłoża. Określono w ten sposób korelację pomiędzy siłą niezbędną do oderwania komórki i powierzchnią adhezji, a także wykazano, że siła oderwania nie jest stała i zależy od sposobu przyłożenia siły. Pomiary MPA pomogły też określić w jaki sposób naprężenie przy oderwaniu komórki od podłoża zależy od wewnętrznych parametrów komórki oraz od prędkości zasysania [144].

Inną techniką umożliwiającą rozciąganie i przemieszczanie struktur biologicznych w celu wyznaczenia ich właściwości mechanicznych [151], w tym wiskoelastycznych [146], oraz oddziaływań międzykomórkowych jest urządzenie nazywane szczypcami optycznymi, jak również pułapką optyczną. Manipulacja obiektami biologicznymi takimi jak komórki, ale również cząsteczki białka oraz nici DNA [151] przy pomocy szczypiec optycznych opiera się na uzyskaniu równowagi pomiędzy dwoma oddziałującymi na badaną strukturę siłami. Siły te pochodzą od skupionej wiązki laserowej, najczęściej promieniowania bliskiej podczerwieni. Na analizowaną strukturę działają siły rozpraszania, które odpychają obiekt wzdłuż kierunku propagacji światła oraz siły gradientowe, ciągnące obiekt wzdłuż przestrzennego gradientu natężenia światła. Gdy w układzie przeważają siły gradientowe obiekt jest przyciągany w kierunku punktu o największej intensywności światła. Znalezienie się obiektu w tym punkcie oznacza uniemożliwienie ruchu we wszystkich trzech kierunkach, co stanowi stabilną pułpkę. W praktyce siły optyczne są najczęściej niewystarczające do manipulacji obiektami biologicznymi [152], a zwiększenie intensywności wiązki laserowej skutkuje uszkodzeniem próbki [146]. Najczęściej rozwiązaniem jest zastosowanie materiałów dielektrycznych, charakteryzujących się wysoką czułością na działanie wiązki światła, np. polistyrenowych kulek. Przyłączenie ich do analizowanych struktur biologicznych nie tylko pozwala na chwytanie i poruszanie pożądaných obiektów, ale także ułatwia obserwację dokonywanych w układzie zmian, poprzez detekcję położenia przyłączonych dielektrycznych kulek. [152]. Szczypce optyczne mogą być wykorzystane do analizy sztywności komórek oraz zmiany tej właściwości w wyniku interakcji sąsiadujących komórek. Badania te, prowadzone na liniach komórkowych raka piersi, pomagają w zrozumieniu zmian zachodzących w komórka nowotworowych

podczas oddziaływania z otoczeniem [145]. Poprawa efektywności pułapki optycznej możliwa jest również poprzez zastosowanie podłoża z kryształu fotonicznego, który wpływa na ruch fotonów, analogicznie do krystalicznych półprzewodników umożliwiających ruch elektronów. Materiał ten posiada fotoniczną przerwę wzbronioną, w której fale w pewnym zakresie długości fali nie mogą się rozchodzić. Pozwala to na ukierunkowanie sygnału świetlnego. Tego typu podłoże przebadano na przykładzie komórek nabłonkowych zarodka, będących komórkami macierzystymi, pod kątem zastosowania go do pomiaru adhezji oraz kontrolowanej organizacji komórek. Pokrycie podłoża hydrofobową powłoką polimerową z parylenu C umożliwiło zbadanie mechanizmu antyadhezyjnego, istotnego w tworzeniu połączeń międzykomórkowych w nerkach [146].

Niezwykle obiecującą, zarówno ze względu na możliwość obrazowania powierzchni, charakterystyki struktury powierzchniowej, ale również pomiaru właściwości mechanicznych takich jak elastyczność, oraz adhezji zarówno komórek jak i tkanek jest mikroskopia sił atomowych będąca przedmiotem kolejnego rozdziału. Pomiar, polegający na skanowaniu powierzchni w kolejnych punktach, umożliwia tworzenie map, odzwierciedlających właściwości badanych materiałów z wysoką rozdzielczością. Zalety tej metody można wykorzystać łącząc jej elementy z inną techniką. Przykładem takiej kombinacji jest technika spektroskopii Ramana wzmocnionej na ostrzu sondy skanującej (TERS, ang. *Tip-enhanced Raman spectroscopy*).

Wzmocnienie sygnału w spektroskopii Ramana jest ważnym zagadnieniem z uwagi na stosunkowo niewielką wydajność tej techniki. Skutkuje to ograniczoną możliwością pomiaru próbek o niskim stężeniu analizowanych substancji. Jedną ze stosowanych modyfikacji spektroskopii Ramana jest powierzchniowo wzmocniona spektroskopia Ramana (SERS, ang. *Surface Enhanced Raman Spectroscopy*). W tej technice wykorzystuje się zjawisko wzmocnienia sygnału ramanowskiego, będące efektem naniesienia analizowanych cząsteczek na chropowatą powierzchnię metalu. Wzmocnienie rozpraszania Ramana jest wynikiem dwóch mechanizmów: wzmocnienia chemicznego oraz wzmocnienia elektromagnetycznego, które jest dominujące [149,153]. Technika TERS jest innym wariantem spektroskopii Ramana, również charakteryzującym się wysoką rozdzielczością. Tak jak w przypadku SERS, poprawa rozdzielczości osiągnięta jest poprzez wzmocnienie sygnału ramanowskiego, wynikające z obecności



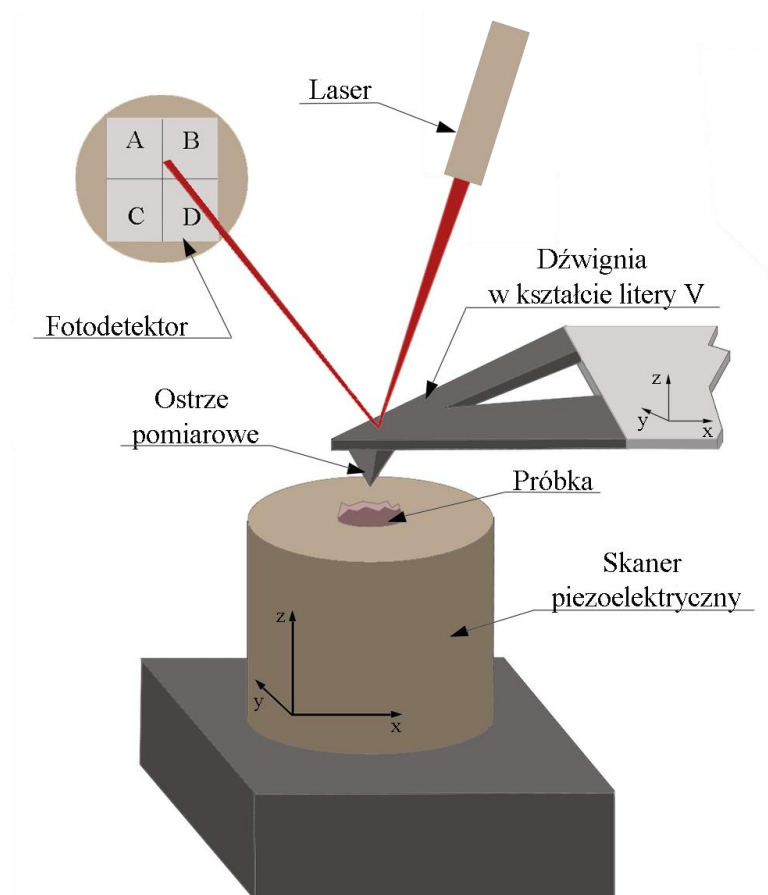
Rysunek 14. Zastosowanie techniki TERS do analizy składu chemicznego biomembrany. a) schemat możliwych ustawień próbnika AFM względem molekuł tworzących membranę. b) Obraz AFM topografii membrany wraz z wyszczególnieniem elementów budulcowych zidentyfikowanych w oparciu o widma Ramana. Na podstawie: [150].

metal. Jednak w przypadku TERS, metal jest naniesiony na sondę, taką jak stosowana jest w technice AFM. Pokryte odpowiednim metalem ostrze pomiarowe o średnicy poniżej 50 nm pozwala na uzyskanie wzmocnienia rozproszenia ramanowskiego na bardzo małym obszarze. Jednocześnie mikroskopia AFM umożliwia analizę struktury powierzchniowej próbki [149]. Kombinacja tych dwóch metod daje możliwość tworzenia map powierzchni przedstawiających topografię, przy jednoczesnym analizowaniu obecnych na nich związków chemicznych (Rys. 14). Obserwacja kolejno rejestrowanych widm pozwala na określenie budowy chemicznej powierzchni w poszczególnych punktach pomiarowych, np. substancji obecnych na komórce bakterii *Staphylococcus epidermidis*. Informacje te są kluczowe dla zrozumienia takich procesów jak adhezja

komórki bakteryjnej, tworzenie biofilmów, czy też patogenezą bakteryjną [149]. Technikę TERS można wykorzystać także do wykrycia modyfikacji białkowych na powierzchni lipidowej. Takie badania mają duże znaczenie w kontekście analizy budowy błony komórkowej, gdyż dokładna znajomość jej struktury jest niezbędna m.in. do zaplanowania procesu dostarczania substancji farmaceutycznych, których wnikanie do komórki wiąże się z koniecznością interakcji ze składnikami błony, w szczególności białkami [150].

5. Mikroskopia sił atomowych AFM

Mikroskop sił atomowych należy do grupy mikroskopów z sondą skanującą (SPM, ang. *Scanning Probe Microscopy*). Rozwój tego typu urządzeń zapoczątkował, użyty po raz pierwszy w 1982 roku, skaningowy mikroskop tunelowy (STM, ang. *scanning tunneling microscope*), służący do analizy materiałów przewodzących prąd elektryczny. Opisany w 1986 r., a powszechnie dostępny od roku 1989 AFM pozwala na wykonywanie pomiarów już bez względu na właściwości elektryczne materiału [154]. Ponadto budowa mikroskopu umożliwia prowadzenie pomiaru zarówno w powietrzu jak również w środowisku ciekłym [155]. Zasada działania mikroskopu sił atomowych opiera się na zastosowaniu sondy skanującej, której ruch można precyzyjnie kontrolować poprzez zastosowanie skanera piezoelektrycznego [156]. Choć AFM był pierwotnie przeznaczony do analizy półprzewodników w skali nanometrycznej [157] szybko znalazł zastosowanie w badaniach nad topografią powierzchni różnych materiałów, w tym w analizie chropowatości [158-159] umożliwiając uzyskanie obrazu z teoretyczną

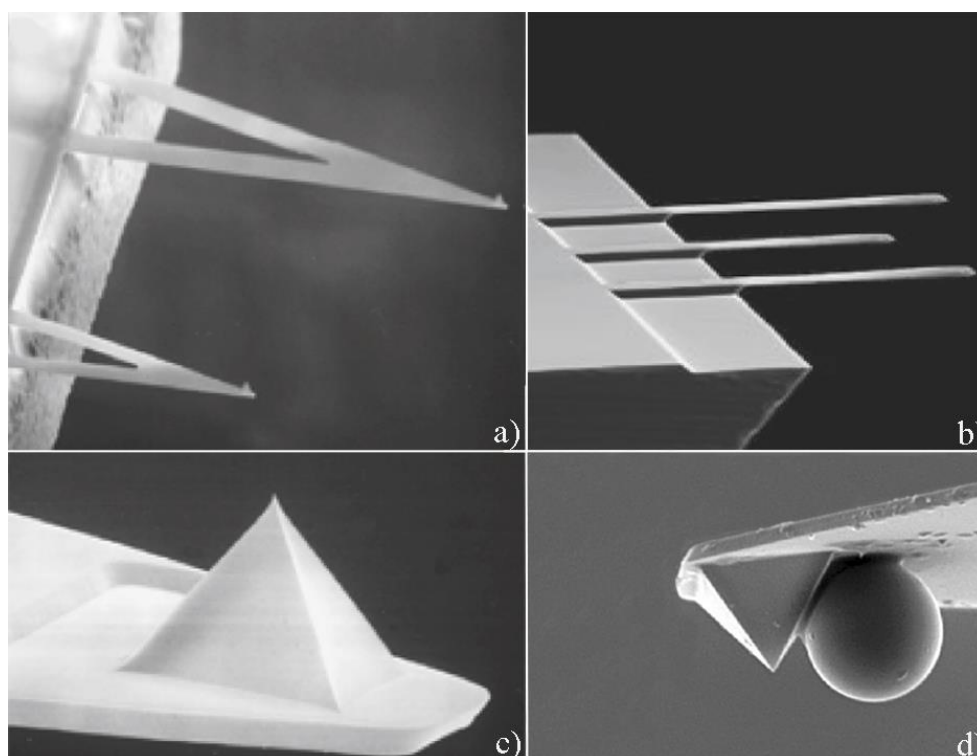


Rysunek 15. Budowa mikroskopu sił atomowych.

rozdzielczością 1-2 nm [160], chociaż w praktyce osiągane są rozdzielczości w zakresie 5-100 nm [161]. AFM stał się również ważnym narzędziem w analizie materiałów biologicznych, m.in. białek [162], DNA [163] oraz zarówno preparatów utrwalonych jak i żywych komórek, umożliwiając badania budowy zewnętrznej, a także wewnętrznej komórek [157]. AFM pozwala również na analizę *In situ* większych próbek takich jak tkanki [164]. Mikroskop sił atomowych służy jednak nie tylko do obrazowania, ale umożliwia dodatkowo pomiar właściwości biomolekuł w trybie spektroskopii sił [165].

5.1. Budowa i zasada pomiaru

Kluczowym elementem budowy mikroskopu (Rys. 15) jest elastyczna [165] dźwignia w kształcie litery V (Rys. 16a) lub belki (Rys. 16b), zakończona ostrzem pomiarowym (Rys. 16c) [156]. Każdy ruch dźwigni jest rejestrowany, zazwyczaj przy pomocy układu optycznego składającego się z lasera, którego światło po odbiciu od dźwigni trafia do fotodetektora [165]. Detektor podzielony jest na cztery obszary: górne sektory A i B oraz dolne C i D [165]. W przypadku braku interakcji pomiędzy ostrzem

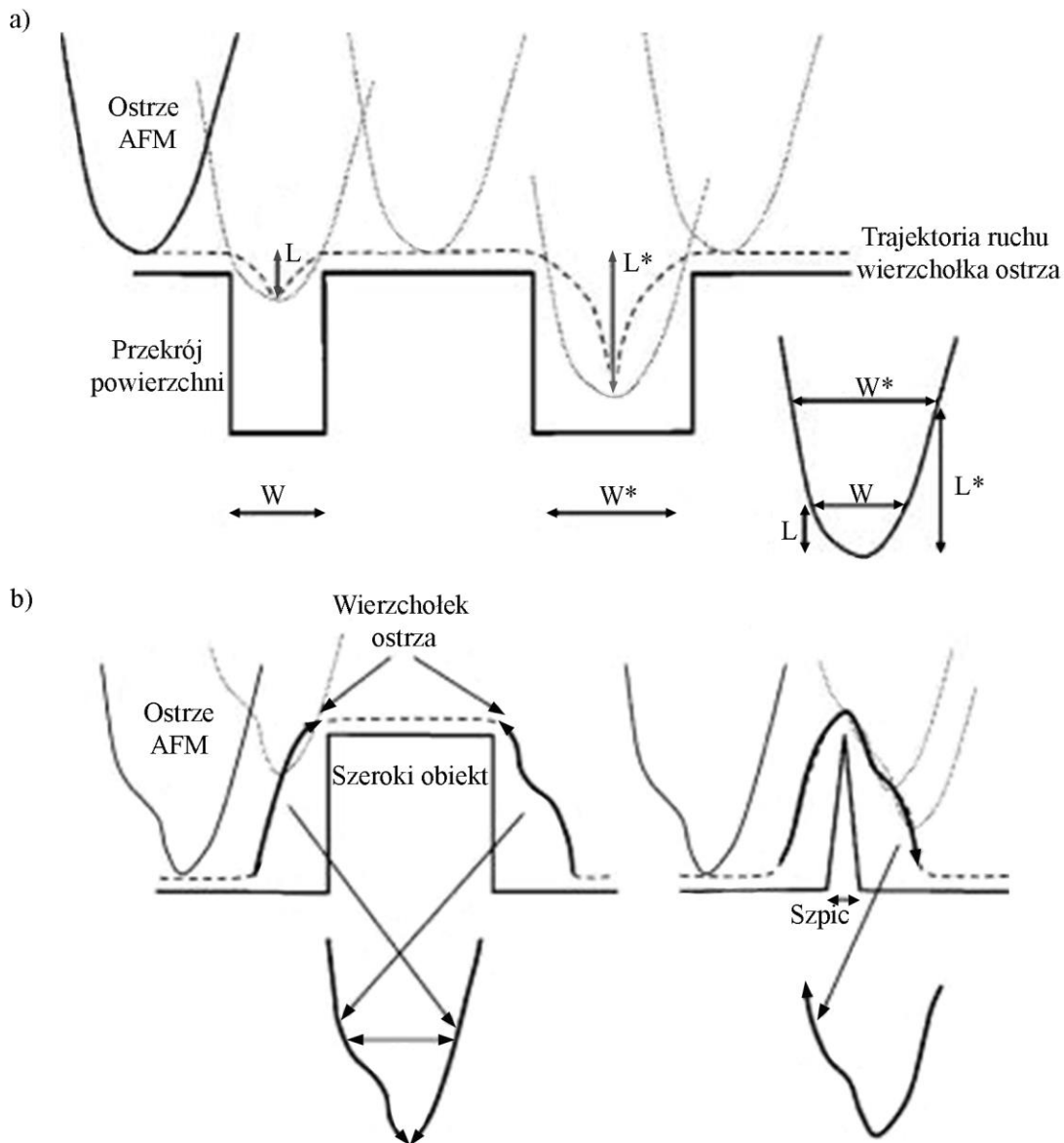


Rysunek 16. Najczęstsze kształty dźwigni i próbników. a) dźwignia w kształcie litery V, b) belka, c) ostrze pomiarowe w kształcie piramidy, d) kulka krzemionkowa przyklejona do dźwigni z ostrzem. Na podstawie [156] (a,b,c) oraz [167] (d).

pomiarowym i powierzchnią próbki promień lasera odbity od dźwigni trafia w środek fotodetektora. Nawet najmniejsze oddziaływanie ostrza pomiarowego z badaną powierzchnią powoduje wychylenie rejestrowanej wiązki laserowej z położenia równowagi [165]. Analiza różnic w intensywności światła trafiającego do poszczególnych sektorów fotodetektora wykorzystywana jest do utworzenia obrazu topografii próbki (różnica pomiędzy górnym i dolnym obszarem), a także pozwala na odzwierciedlenie sił tarcia poprzez analizę bocznych i skrętnych ugięć dźwigni (różnica pomiędzy lewym i prawym sektorem) [156]. Rozdzielczość pomiaru wynosi ok 10 nN i jest ograniczona stałą siłową oraz szumem termicznym dźwigni [166].

Szczególnie istotną w pomiarze AFM rolę odgrywają właściwości dźwigni z ostrzem pomiarowym. Sonda ta o wymiarach wynoszących zazwyczaj 100-200 μm długości, 10-40 μm szerokości i 0,3-2 μm grubości [168] oraz promieniu krzywizny ostrza w przedziale 5-60 nm i kącie połówkowym stożka wynoszącym 35° [169], jest wykonana najczęściej z krzemu lub azotku krzemu [156]. Możliwe jest utworzenie ostrzy o mniejszym kącie połówkowym, np. z zastosowaniem nanorurek węglowych, jednak, z uwagi na kruchość, ich praktyczne zastosowanie jest ograniczone [169]. Dobór materiałów do otrzymania sond podyktowany jest ich właściwościami mechanicznymi, w tym modułem sprężystości oraz granicą plastyczności, które determinuje z kolei sposób prowadzenia pomiaru, w szczególności wielkość siły z jaką ostrze oddziałuje z próbką. Stała siłowa oraz moduł sprężystości opisujące właściwości próbników, są wielkościami określającymi wielkość odkształcenia w wyniku rozciągania oraz ściskania. Znajomość tych parametrów, wyznaczonych osobno dla każdej dźwigni, jest niezbędna w celu doboru odpowiednich sond do pomiaru, a także do wyznaczenia właściwości badanych materiałów [170]. Pomiaru wykonywane z użyciem dużej siły wymagają zastosowania odpornych na odkształcenia, sztywnych próbników (o dużej stałej siłowej), podczas gdy analizy, w których wykorzystywane są niewielkie siły lub badana próbka może łatwo ulec uszkodzeniu muszą być prowadzone przy pomocy miękkich sond (o małej stałej siłowej). Nie bez znaczenia jest również geometria ostrza, od której zależy możliwość zdefiniowania szczegółów topograficznych powierzchni. Od kształtu ostrza, promienia jego krzywizny zależy powierzchnia kontaktu pomiędzy sondą i próbką oraz deformacja próbki podczas nacisku. Struktury powierzchniowe o rozmiarach mniejszych niż powierzchnia kontaktu nie są rejestrowane w trakcie pomiaru. W przypadku pomiarów powierzchni o dużej chropowatości ostrze o rozmiarze większym niż rozmiar szczelin

i zagłębień próbki nie pozwala na zobrazowanie rzeczywistej powierzchni (Rys. 17a), a uzyskany obraz odzwierciedla nie tylko topografię powierzchni, ale również kształt sondy [156] (Rys. 17b).

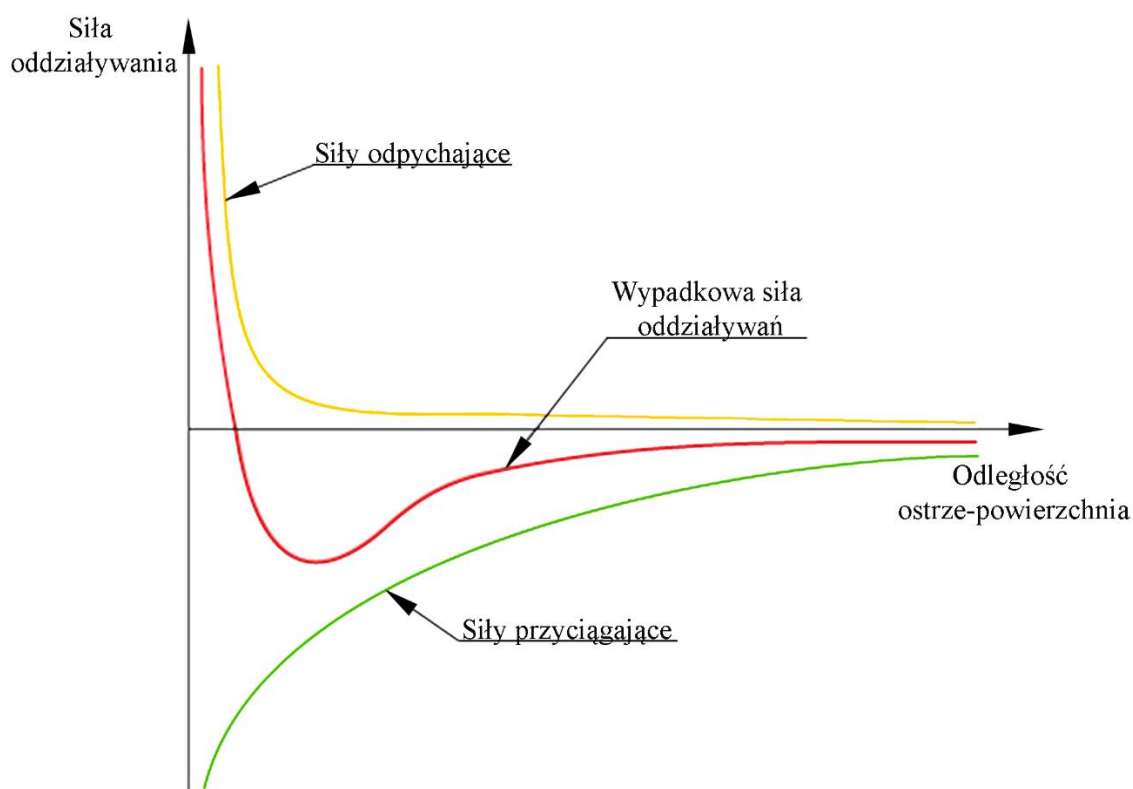


Rysunek 17. Ograniczenia pomiaru wynikające z geometrii ostrza: a) zagłębienia powierzchni, do których nie zmieści się ostrze nie zostają zobrazowane, b) wystające ponad powierzchnię elementy zostają odwzorowane poprzez kształt próbki. W i W^* - szerokość zagłębień w powierzchni oraz odpowiadające im głębokości L oraz L^* na jaką próbnik może wsunąć się do zagłębienia w powierzchni. Na podstawie: [173].

W celu poprawy obrazowania stosowane są modyfikacje ostrza, które mogą obejmować utworzenie powłoki refleksyjnej, magnetycznej lub przewodzącej [171]. Najczęściej stosuje się powlekanie ostrza złotem, i chociaż opisywane jest również modyfikowanie powierzchni sondy wolframem lub chromem, ich stosowanie nie jest popularne. Dodatkowo ostrza mogą być poddawane funkcjonalizacji, czyli modyfikacji chemicznej, która ma na celu umożliwienie oddziaływania z molekułami znajdującymi się powierzchni próbki, np. przeciwciałami [169]. W przypadku niektórych badań, zwłaszcza materiałów biologicznych, korzystne okazuje się zwiększenie powierzchni kontaktu realizowane przez przyklejenie w miejsce ostrza szklanej kulki o średnicy wynoszącej najczęściej 10-40 μm (Rys. 16d). Zastosowanie kulki pozwala na zwiększenie powierzchni kontaktu o około rząd wielkości, zmniejsza się natomiast, także w przybliżeniu o rząd wielkości, wgłębienie sondy w próbkę. Dzięki temu zmniejsza się ryzyko uszkodzenia próbki w czasie pomiaru. Ponadto możliwa jest funkcjonalizacja przyklejonych do dźwigni kulek, co umożliwia pomiar oddziaływań pomiędzy molekułami, zwiększając jednocześnie, o rząd wielkości, liczbę wiązań tworzących się pomiędzy próbnikiem i powierzchnią próbki [172].

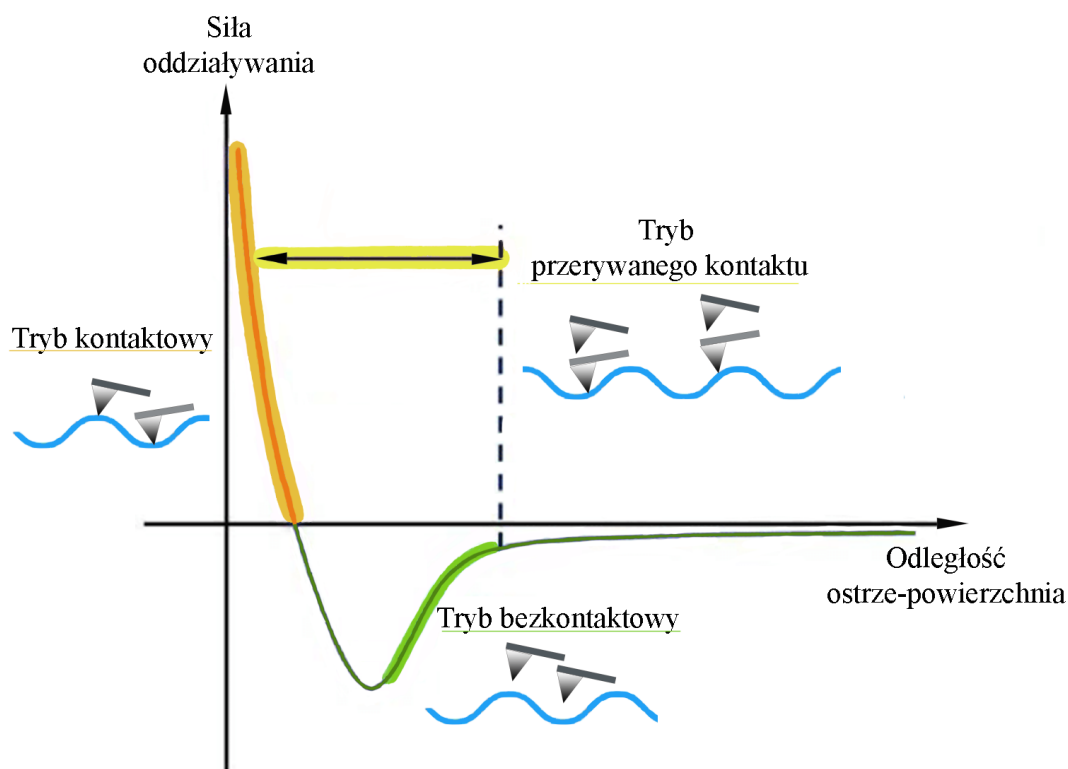
Pomiary wymagające precyzyjnego zbliżania i oddalania ostrza od powierzchni (oś z), a także przesuwania się ostrza względem powierzchni (oś x-y) są realizowane poprzez zastosowanie elementów piezoelektrycznych wykonanych z tytanianu ołowiuowo- cyrkonowego (Pb,Zr)TiO₃ [168]. Zastosowany w skanerach odwrotny efekt piezoelektryczny [174] polega na zmianie rozmiaru elementów utworzonych z materiałów wykazujących właściwości piezoelektryczne w wyniku zmian przyłożonego napięcia [156]. Wynika on z rozsunięcia jonów, z których zbudowany jest kryształ piezoelektryczny, pod wpływem sił elektrostatycznych, a obserwowane odkształcenie jest proporcjonalne do przyłożonego napięcia [175]. Kryształy piezoelektryczne mogą być umieszczone zarówno w głowicy skanującej, z umieszczoną na niej sondą, jak również w obrębie stolika skanującego, na którym umieszcza się próbkę. Skanowanie, jest więc możliwe poprzez poruszanie zarówno głowicą jak i próbką. Skaner może przyjmować kształt walca, który może rozciągać się zgodnie z osią z bądź wyginać w kierunkach x i y. Układy piezoelektryczny mogą również stanowić osobne dla każdego kierunku kryształy [156] tworzące konstrukcje określane angielską nazwą *tripod* (ang. statyw, trójnóg) (ruch w trzech wymiarach), elementy typu stół (ruch dwuwymiarowy) i podobne [176].

Próbka oraz znajdujące się w jej bliskiej odległości ostrze pomiarowe wykazują liczne oddziaływania na poziomie atomowym [166]. Siła działająca w czasie pomiaru na próbnik jest wypadkową przyciągających oraz odpychających sił, których działanie zależne jest od odległości ostrze-próbka, jak również od środowiska pomiaru (Rys. 18). Siły jakim podlegają ostrze oraz próbka mogą mieć m.in. charakter oddziaływań dipolowych, kapilarnych, dalekiego zasięgu, wiązań chemicznych, w tym interakcji przeciwciało-antygen i receptor-ligand, a w środowisku ciekłym także sił wynikających z obecności podwójnej warstwy elektrycznej, hydratacji i solwatacji lub oddziaływań hydrofobowych. W praktyce jednak najistotniejszą rolę w interakcjach rejestrowanych w czasie pomiaru odgrywają dalekozasięgowe siły elektrostatyczne oraz krótkozasięgowe oddziaływania van der Waalsa [155]. Siły odpychania wynikają głównie z nakładania się orbitali elektronowych atomów ostrza i próbki. Dominujące siły przyciągania są natomiast związane z oddziaływaniami van der Waalsa będącymi następstwem indukowania oddziaływań dipolowych [177].



Rysunek 18. Oddziaływania ostrze-powierzchnia.

Ze względu na odległość ostrza od próbki w trakcie trwania pomiaru wyróżnić można tryb kontaktowy, bezkontaktowy oraz przerywanego kontaktu. Poza sposobem prowadzenia pomiaru tryby te różnią się rodzajem mierzonych oddziaływań (Rys. 19).



Rysunek 19. Tryby pracy AFM: kolor pomarańczowy- tryb kontaktowy, kolor żółty- tryb przerywanego kontaktu, kolor zielony- tryb bezkontaktowy.

W trybie kontaktowym sonda znajduje się w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią próbki [156,165]. Wyróżnia się dwie możliwości prowadzenia pomiarów w trybie kontaktowym: ze stałą siłą oraz ze zmienną siłą. W trybie stałej siły ugięcie dźwigni, a przez to również siły utrzymywane jest na stałym poziomie. W tym celu wykorzystuje się mechanizm sprzężenia zwrotnego, który porównuje sygnał z fotodetektora z pewną wartością zadaną i dobiera wartość napięcia przyłożonego do skanera piezoelektrycznego zmieniając odległość ostrza od próbki (wysokość z), tak aby zapewnić stałą wartość siły. Zmiana wartości napięcia z jest monitorowana i jako funkcja pozycji w kierunkach osi x i y wykorzystana do zobrazowania topografii badanej powierzchni. Tryb pracy ze zmienną siłą nie wymaga stosowania mechanizmu sprzężenia zwrotnego. Wówczas odległość z ostrza od próbki pozostaje stała, rejestrowane są natomiast wychylenia dźwigni, będące podstawą stworzenia obrazu topografii próbki. Tryb pomiaru ze zmienną siłą można zastosować jedynie w analizie stosunkowo gładkich powierzchni, jednak umożliwia on pomiar z lepszą rozdzielczością niż w tryb stałej siły [156]. Podczas pomiaru w trybie kontaktowym dominującą rolę pełnią oddziaływania odpychające. Gdy pomiar jest prowadzony w powietrzu, na powierzchni badanej próbki dochodzi do absorpcji wody, co prowadzi do powstania dodatkowej, silnej siły przyciągającej,

wynikającej z oddziaływań van der Waalsa. W czasie pomiaru w cieczy wypadkowe siły van der Waalsa są niższe, co wynika z obecności dielektryka pomiędzy próbką a ostrzem. Bardziej znaczący staje się wówczas wkład oddziaływań elektrostatycznych [177]. Natomiast w przypadku gdy w środowisku pomiaru znajduje się elektrolit, dochodzi do ekranowania sił kulombowskich, ze względu na obecność jonów w roztworze [155]. Tryb kontaktowy umożliwia szybki i stosunkowo prosty pomiar, dający wynik charakteryzujący się dobrym stosunkiem sygnału do szumu. Wiąże się on jednak z szeregiem trudności, związanych z ryzykiem uszkodzenia próbki poprzez jej zarysowanie, bądź usunięcie słabo związanych z podłożem obiektów, co może prowadzić do zanieczyszczenia lub uszkodzenia ostrza pomiarowego [165].

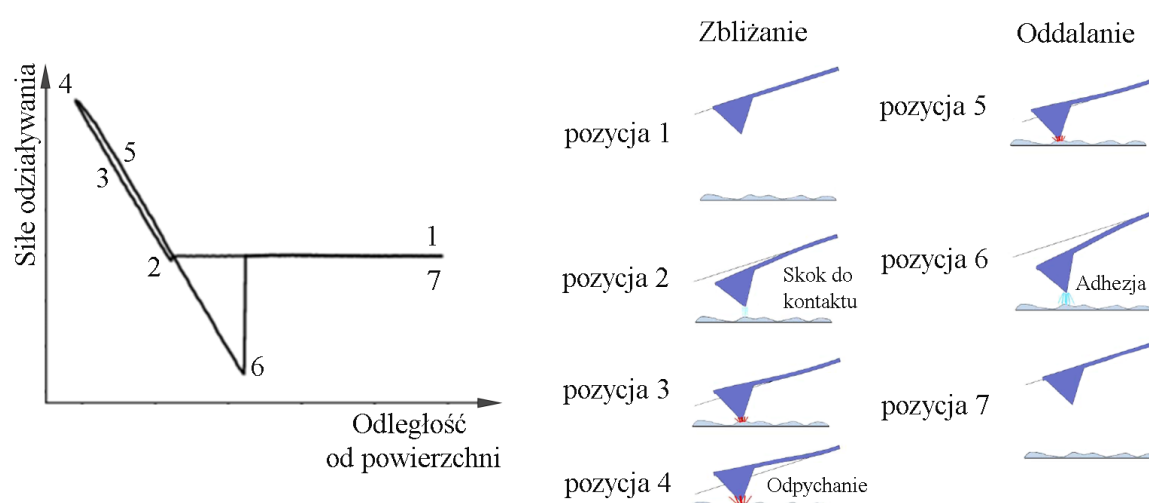
W metodzie bezkontaktowej odległość pomiędzy ostrzem i próbką wynosi 1-10 nm, a dźwignia sondy oscyluje z amplitudą rzędu kilku nanometrów. Dźwignia wzbudzana jest do sinusoidalnych drgań o częstotliwości zbliżonej do jej własnej częstotliwości rezonansowej [177]. Zbliżanie się ostrza do powierzchni skutkuje pojawieniem się oddziaływań dalekiego zasięgu, w tym elektrostatycznych oraz van der Waalsa [156]. Siły te powodują zmiany w częstotliwości, amplitudzie oraz fazie drgań dźwigni, które mogą być mierzone i przekształcone na informacje o topografii [177]. W celu zapewnienia braku kontaktu pomiędzy ostrzem i próbką prowadzona jest analiza przesunięcia w fazie drgania dźwigni w stosunku do częstotliwości początkowej i na tej podstawie dokonywana jest korekta wartości z przy pomocy układu sprzężenia zwrotnego. Tryb bezkontaktowy pozwala na pomiar delikatnych i łatwo odkształcalnych próbek. Ograniczeniem w tej metodzie jest duża wrażliwość na absorbujące się na powierzchni próbki cząsteczki, w szczególności cząsteczki wody, które stanowiąc artefakty mogą znacznie ograniczać rozdzielczość pomiaru. Tryb ten nie umożliwia prowadzenia pomiaru w cieczy [156].

W przypadku trybu przerywanego kontaktu, tzw. *tapping mode*, dźwignia, podobnie jak w przypadku trybu bezkontaktowego, zostaje wzbudzona do częstotliwości zbliżonej drganiom własnym dźwigni [156], jednak w metodzie tej amplituda drgań może wynosić nawet około 100 nm. W ten sposób podczas drgań dochodzi do krótkotrwałego kontaktu ostrza z próbką, któremu towarzyszy zmiana amplitudy drgań. Zmiana amplitudy jest rejestrowana przy pomocy układu sprzężenia zwrotnego w celu dobrania odpowiedniej, zapewniającej jak najmniejsze oddziaływania ostrza z powierzchnią, częstotliwości drgań [177]. W trybie przerywanego kontaktu nie dochodzi do „drapania”

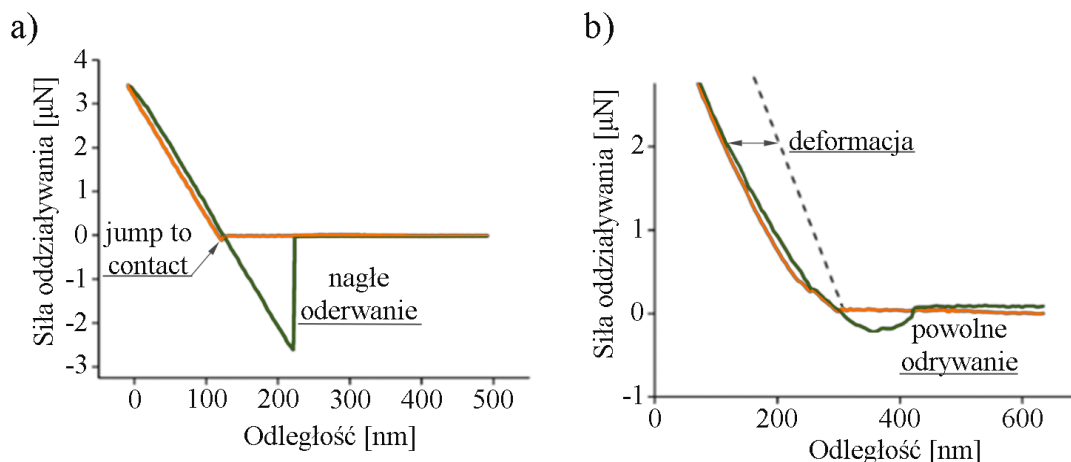
próbki, dzięki czemu nie jest ona niszczona, a ostrze nie ulega zniszczeniu bądź zanieczyszczeniu. Ponadto pomiar kontrastu fazowego pozwala na uzyskanie szczegółowych informacji o powierzchni próbki. Pomiar tą metodą jest jednak bardziej wymagający pod względem umiejętności operatora, a kolejne pomiary wymagają więcej czasu w porównaniu z trybem kontaktowym [165].

5.2. Spektroskopia sił

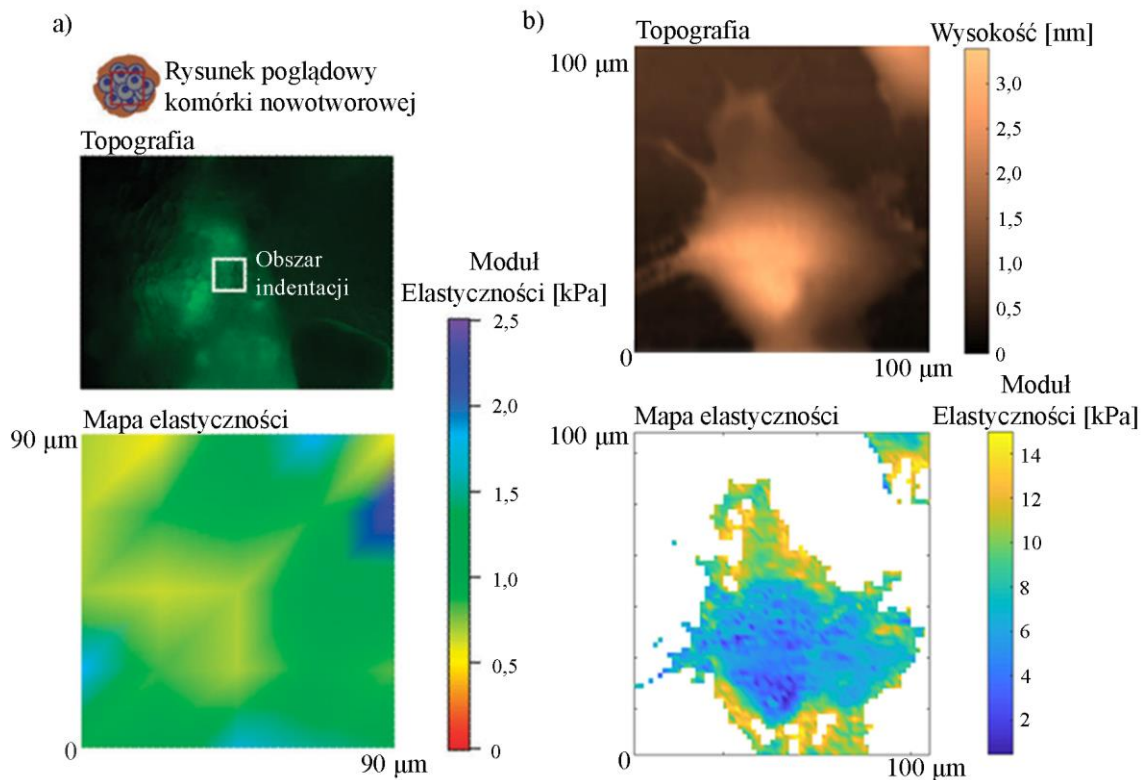
W kontekście badań nad właściwościami materiałów ważną rolę odgrywiają pomiary AFM prowadzone w trybie spektroskopii sił. Odkształcenie próbki podczas nacisku próbnikiem wpływa bezpośrednio na powierzchnię kontaktu. Deformacja próbki jest natomiast związana z właściwościami mechanicznymi badanego materiału, w szczególności jego elastycznością. Jednocześnie podczas odsuwania się ostrza pomiarowego od powierzchni działają siły, które przeciwdziałają temu ruchowi. Siła niezbędna do oderwania próbki od próbki odpowiada sile adhezji [178]. Wynikiem pomiaru w trybie spektroskopii sił są krzywe siłowe, które odzwierciedlają ugięcia dźwigni w wyniku oddziaływania z powierzchnią próbki (Rys. 20). Dźwignia początkowo niepodlegającej oddziaływaniom z powierzchnią sondy znajduje się w pozycji 1. Gdy ostrze znajdzie się w polu działania sił przyciągających następuje gwałtowne zbliżenie ostrza do powierzchni, tzw. *jump-to-contact*, czyli skok do punktu kontaktu (pozycja 2.). Dalszy ruch głowicy pomiarowej w kierunku próbki prowadzi do osiągnięcia stanu, w którym ostrze przestaje zbliżać się do powierzchni, natomiast dźwignia ulega ugięciu (pozycja 3.). W wyniku działania sił przyciągających, w tym



Rysunek 20 Ugięcia dźwigni podczas pomiaru AFM. Na podstawie: [181]



Rysunek 21. Krzywe siłowe przedstawiająca zależność wychylenia dźwigni od odległości ostrza od powierzchni próbki. a) Materiał twardy. Nachylenie krzywej jest równe stałej siłowej ($k=30 \text{ N/m}$). W przebiegu krzywej rejestrowanej podczas dojeżdżania (linia pomarańczowa) widoczny jest charakterystyczny skok do punktu kontaktu, a oderwanie ostrza od powierzchni (linia zielona) następuje nagle. b) Materiał miękki, posiadający zdolność do odwracalnej deformacji. Odchylenie krzywej od linii bazowej (linia przerywana) symbolizującej zerową deformację, obrazuje obserwowaną deformację próbki. Zbliżanie ostrza (linia pomarańczowa) następuje bez skoku do powierzchni, natomiast jego odrywanie (linia zielona) jest powolne. Na podstawie: [182].



Rysunek 22. Przykładowe mapy elastyczności komórek. Na podstawie: [183] (a) i [184] (b).

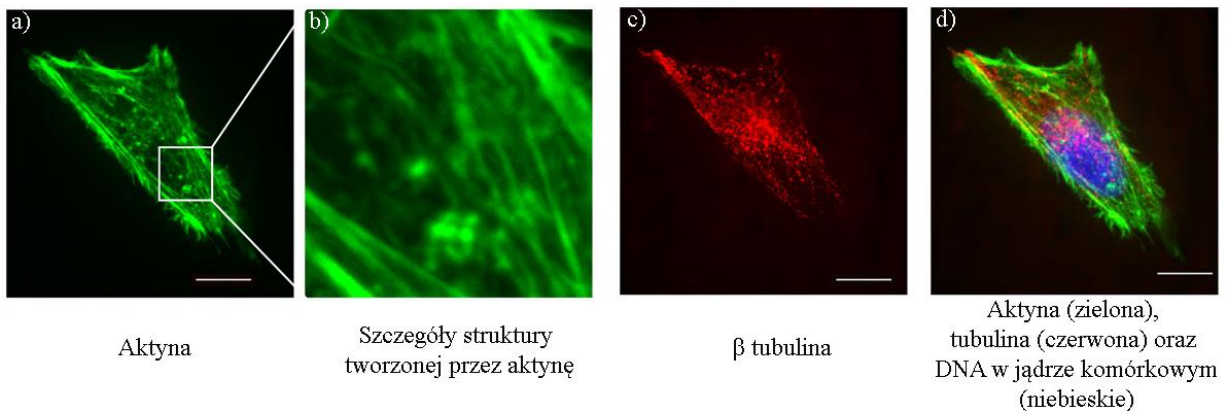
adhezji, pomimo oddalania się głowicy pomiarowej, ostrze nie odrywa się od razu od powierzchni, dochodzi natomiast do wygięcia dźwigni (pozycja 6.). Dalsze odsuwanie głowicy skutkuje oderwaniem ostrza od powierzchni, tzw. *jump-off-contact* czyli odskoczeniem od punktu kontaktu [166,179]. Obserwacja przebiegu i nachylenia krzywych oraz analiza położenia punktu kontaktu pozwala na wyznaczenie właściwości mechanicznych materiałów (Rys. 21) [165]. Ugięcia dźwigni rejestrowane w kolejnych, położonych blisko siebie punktach powierzchni pozwalają na tworzenie map rozkładu sił (Rys. 22), odpowiadających m.in. elastyczności. Mapy te są niezwykle przydatne w analizie materiałów biologicznych, gdyż umożliwiają np. ustalenie położenia jądra w komórce w oparciu o zmianę sztywności [180].

5.3. Mikroskop sił atomowych w analizie elastyczności komórek i tkanek

Jak już wspomniano, jedną z cech warunkujących prawidłowe funkcjonowanie organizmu są właściwości mechaniczne komórek, a co za tym idzie również tkanek. Za strukturę oraz elastyczność komórki, odpowiedź komórki na bodźce zewnętrzne, a także zdolność do przemieszczania się odpowiada cytoszkielet. Jest to sieć zbudowana z białek: aktyny tworzącej filamenty aktynowe, tubuliny, będącej materiałem budulcowymi mikrotubuli oraz białek tworzących filamenty pośrednie (Rys. 23). Stabilność komórki zapewnia ponadto błona cytoplazmatyczna [185] zbudowana z lipidów tworzących dwuwarstwę, oraz białek [186]. Obserwacja cytoszkieletu komórki jest możliwa poprzez barwienie fluorescencyjne poszczególnych jego elementów oraz obrazowanie z zastosowaniem mikroskopii konfokalnej [187-188].

Parametrem opisującym elastyczność komórek jest moduł Younga, nazywany również modułem elastyczności, który określa wielkość siły niezbędnej do odkształcenia materiału. Z fizycznego punktu widzenia moduł Younga opisuje liniowe odkształcenie jednorodnego materiału. W przypadku układów złożonych z wielu komponentów o różnych właściwościach, w tym modułach Younga, można mówić o module elastyczności całego obiektu. W praktyce określenia te są używane często w obydwu kontekstach. Z tego względu również w tej pracy określenia te będą używane zamiennie, przyjmując oznaczenia stosowane w większości przytaczanych publikacji oraz omawianych modelach. Moduł Younga E w zakresie stosowalności prawa Hook'a, czyli w zakresie oddziaływań sprężystych jest dany wzorem:

$$E = \frac{\sigma}{\varepsilon}, \quad (1)$$



Rysunek 23. Struktura wnętrza komórki zobrażowana przy użyciu mikroskopu konfokalnego. Barwienie wykonano przy pomocy odpowiednio pepytydu pozyskiwanego z muchomora *Amanita phalloides* dla aktyny, przeciwciał β tubuliny [EPR1330] dla tubuliny oraz barwnika fluorescencyjnego Hoechst, wybarwiającego DNA. Poprzez barwienie w strukturze komórki wyszczególniono: a) filamety aktynowe (kolor zielony), szczegółowo przedstawione w części b), prezentującej kwadratowy obszar o boku $10\ \mu\text{m}$, c) mikrotubule (kolor czerwony) oraz d) jądro komórkowe (kolor niebieski). Powiększenie 100-krotne, linia skali odpowiada długości $10\ \mu\text{m}$. Na podstawie: [188].

gdzie: $\sigma = \frac{F}{A}$ - przyłożone naprężenie,

F- siła zewnętrzna,

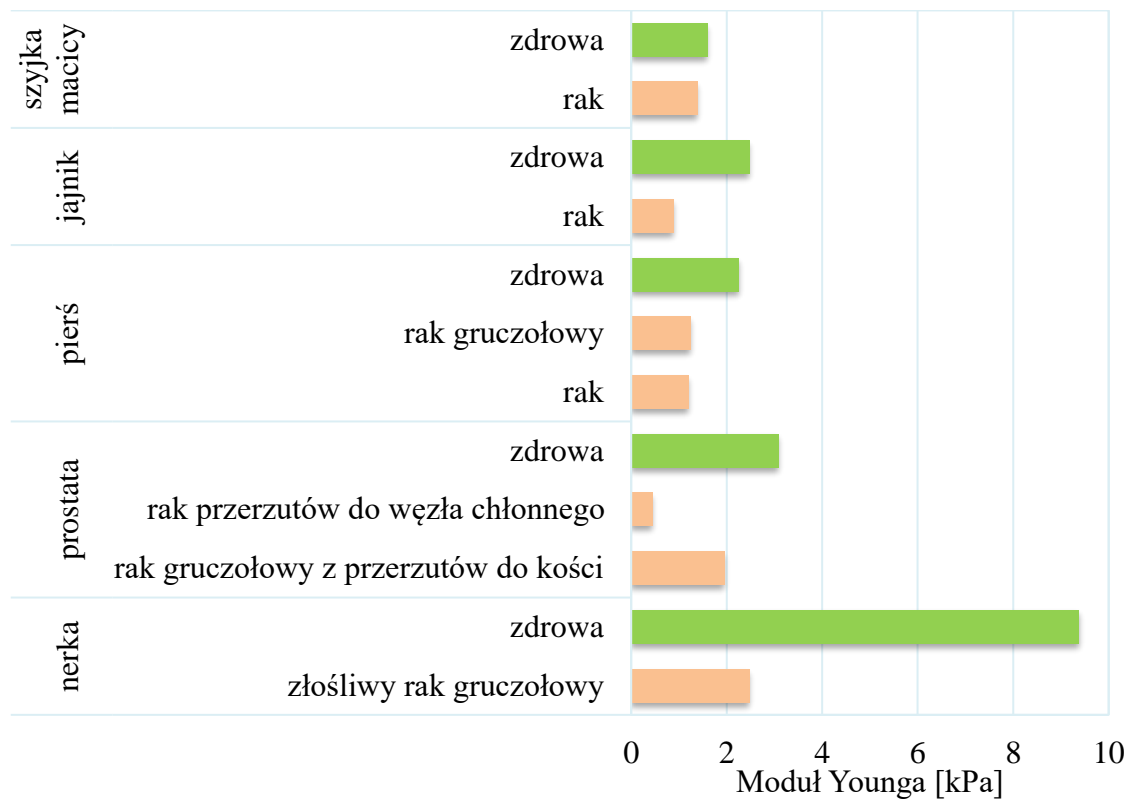
A- pole przekroju,

$\varepsilon = \frac{dl}{l}$ - odkształcenie liniowe, odpowiadające zmianie długości materiału dl do

początkowej długości l. Jednostką modułu Younga jest paskal (Pa): $[1\text{Pa} = 1\frac{\text{N}}{\text{m}^2}]$ [166].

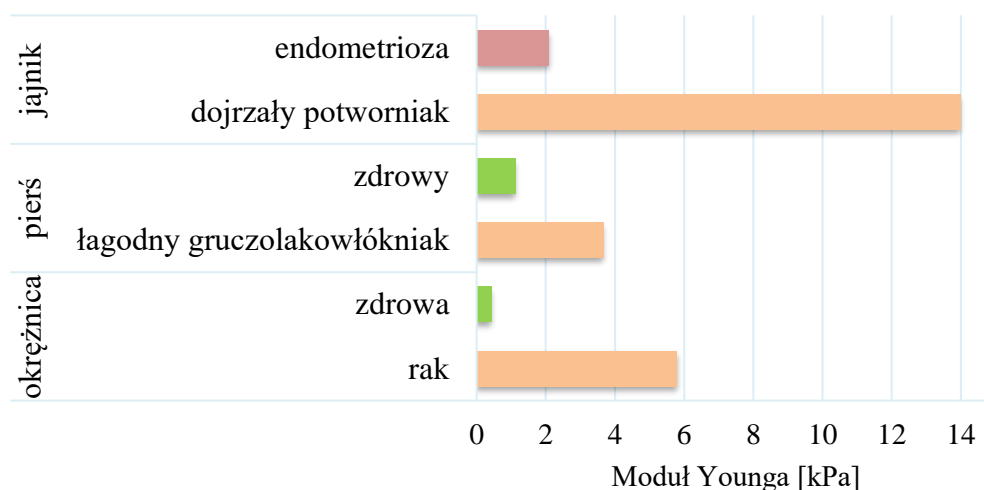
W rzeczywistości odpowiedź komórki na stres, związany np. z przyłożeniem zewnętrznej siły ma charakter wiskoelastyczny, czyli lepkosprężysty. Oznacza to, że parametrami charakteryzującymi zachowanie komórki są zarówno elastyczność jak również lepkość. Lepkość komórki związana jest z biologicznymi procesami zachodzącymi w jej wnętrzu i wynika z tarcia wewnętrznego będącego następstwem przepływów płynów w obrębie komórki. Wśród metod umożliwiających pomiar lepkości wyróżnić może te same techniki, które pozwalają na wyznaczenie elastyczności, w tym szczytce optyczne, mikroskopię sił atomowych oraz zastosowanie mikropipety. Trudność wyznaczenia lepkości związana jest ze specyfiką tych pomiarów, które wywołując stres w komórce powodują jednocześnie zmiany w jej właściwościach, także lepkości, stąd też otrzymany wynik może być nieprawidłowy [189].

Zachodzące w komórkach przemiany dotyczące elastyczności są związane z reorganizacją białek tworzących strukturę komórki [180,185,190]. Zmiany właściwości mechanicznych towarzyszą fizjologicznym procesom w komórce, jak np. decidualizacji komórek endometrium [20], ale są również następstwem patologicznych przemian zachodzących podczas rozwoju chorób. Zmiany modułu elastyczności są wystarczająco jednoznaczne, aby mogły stanowić marker m.in. chorób nowotworowych. Liczne badania wskazują, że komórki nowotworowe wykazują większą podatność na deformację, w porównaniu z komórkami zdrowymi (Rys. 24) [22-25]. Co ciekawe, przeciwne zjawisko ma miejsce w przypadku tkanek, w których postępuje rozwój nowotworu. Dla zmienionych procesem chorobowym tkanek zaobserwowano wzrost wartości modułu Younga w odniesieniu do tkanek niezmienionych przez nowotwór (Rys. 25) [26-28]. Stwierdzono ponadto, że zmiana modułu Younga jest zależna od stopnia zaawansowania nowotworu. Wartości modułu elastyczności wyznaczone dla poszczególnych stadiów nowotworu w komórkach nabłonkowych jajnika myszy przedstawiono w tabeli 3. Dane te pokazują, że wraz z rozwojem choroby elastyczność komórek spada. Podobną



Rysunek 24. Wartości modułu Younga wybranych komórek zdrowych i nowotworowych, w oparciu o dane literaturowe [22-25].

tendencję zaobserwowano w przypadku lepkości komórek. Obrazowanie z użyciem mikroskopu konfokalnego wykazało, że koncentracja włókien aktynowych w komórkach wczesnego stadium jest wyższa, w porównaniu z bardziej zaawansowanymi nowotworami, co jest jedną z hipotez tłumaczących to zjawisko [148].



Rysunek 25. Wartości modułu Younga wybranych tkanek zdrowych i nowotworowych, w oparciu o dane literaturowe [26-28].

Tabela 3. Właściwości lepko-sprężyste komórek nabłonkowych mysiego jajnika w różnych stadiach rozwoju nowotworu [148].

	Stadium wczesne	Stadium pośrednie	Stadium późne
Moduł elastyczności E	1,097 ± 0,682 kPa	0,796 ± 0,441 kPa	0,549 ± 0,281 kPa
E przy max histogramu	0,652 kPa	0,477 kPa	0,382 kPa
Lepkość μ	144,7 ± 102,4 Pa·s	103,1 ± 53,76 Pa·s	50,74 ± 29,72 Pa·s
μ przy max histogramu	69,69 Pa·s	60,40 Pa·s	25,53 Pa·s

6. Modelowanie komputerowe komórek

Jak omówiono w poprzednim rozdziale, właściwości mechaniczne komórek i tkanek odgrywają istotną rolę w prawidłowym funkcjonowaniu organizmu, jak również w rozwoju zmian patologicznych. Techniki pozwalające na analizę struktury i właściwości mechanicznych komórek i tkanek dostarczają wielu informacji umożliwiając lepsze zrozumienie ich funkcji i zachodzących w nich zmian. Inną metodą zrozumienia właściwości komórek i tkanek jest modelowanie komputerowe. Modelowanie jest oparte o wiedzę o właściwościach komórek pozyskaną w oparciu o dane eksperymentalne pozyskane w wyniku badań przeprowadzonych na żywych komórkach [191]. Pozwala ono na analizę zachowania komórek, np. podczas indentacji odpowiadającej pomiarowi AFM [192-193], bez konieczności pozyskiwania dużej liczby komórek. Do obliczeń wykorzystuje się modele, które w pewnym uproszczeniu odzwierciedlają budowę i właściwości komórki [22,194]. Modelowanie pozwala na opisanie m.in. rozprzestrzeniania się przyłożonego naprężenia i przenoszenia go na wybrane komponenty komórki, m.in. cytoszkielet [194]. Jedną z metod wyznaczania pożądaných danych jest zastosowanie metody elementów skończonych (FEM, ang. *finite element method*) [192-193,195].

6.1. Modele matematyczne komórek

Uproszczenie w odniesieniu do budowy i właściwości komórki, stosowane w celu utworzenia modelu jest niezbędne, aby komórka mogła zostać opisana konkretnymi, możliwymi do rozwiązania równaniami. Często jednak może się ono okazać zbyt duże, aby opisać rzeczywiste zachowanie komórki, gdyż nie uwzględniają wszystkich jej elementów i w ograniczony sposób opisują właściwości, np. pomijając lepkość komórki [22]. W literaturze naukowej opisanych jest wiele modeli, które zarówno w bardzo prosty jak i bardziej skomplikowany sposób opisują komórkę (Rys. 26).

Jednym z możliwych podejść do opisu komórki jest opisanie jej jako jednorodnego obiektu, o dobrze zdefiniowanej granicy, charakteryzującego się pewnym modułem elastyczności. W zależności od kształtu próbnika, którym przeprowadza się teoretyczną indentację, można wyróżnić model Hertza (Rys. 26a) dla próbnika sferycznego, oraz model Snedдона (Rys 26b) odpowiedni dla stożkowego indentera. Równania dla tych modeli wiążą przyłożoną siłę z modułem elastyczności oraz głębokością indentacji:

dla modelu Hertza:

$$F = \frac{16}{9} E \sqrt{\frac{R_{\text{próbnika}} R_{\text{komórki}}}{R_{\text{próbnika}} + R_{\text{komórki}}}} \delta^{3/2} \quad (2)$$

dla modelu Sneddona:

$$F = \frac{8}{3\pi} E \cdot \tan \alpha \cdot \delta^2 \quad (3)$$

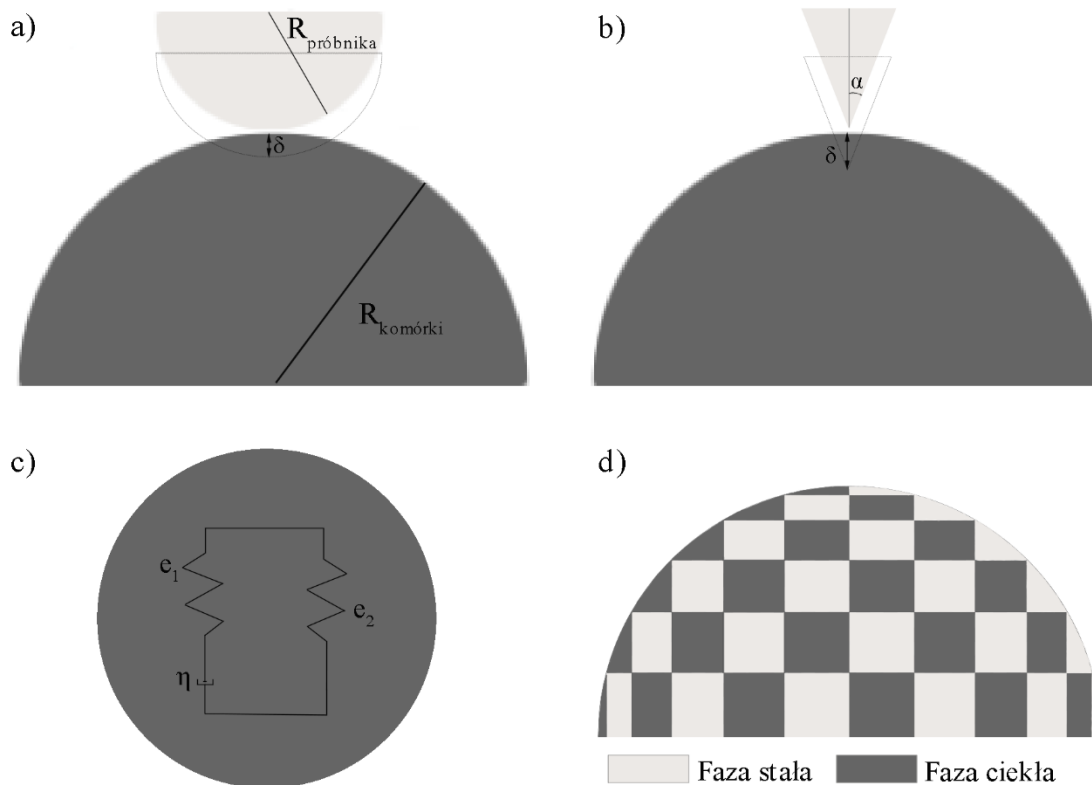
gdzie: F- przyłożona siła,

E- moduł elastyczności,

δ - głębokość indentacji,

$R_{\text{próbnika}}$ - promień sferycznego próbnika,

$R_{\text{komórki}}$ - promień semisfery stanowiącej komórkę,



Rysunek 26. Schematyczna budowa komórki w wybranych modelach: a) model Hertza: półsfera o promieniu $R_{\text{komórki}}$ indentowana na głębokość δ sferycznym próbnikiem o promieniu $R_{\text{próbnika}}$; b) model Sneddona: powierzchnia indentowana na głębokość δ stożkowym próbnikiem o kącie połówkowym α ; c) liniowy wiskoelastyczny model bryłowy: bryła wiskoelastyczna gdzie stałe elastyczności (e_1 i e_2) są przedstawione jako sprężyna, a stała lepkościowa η , jako tłok; d) model dwufazowy z elastyczną fazą stałą (cytoskielet, białka) oraz fazą ciekłą (cytozol składający się z wody oraz rozpuszczonych w niej białek i jonów).

α - kąt połówkowy stożkowego próbnika. W obydwu modelach przyjęto wartość współczynnika Poissona wynoszącą 0,5. Poczynione w tych modelach uproszczenia są duże, dlatego modele te mogą być zastosowane tylko gdy spełniony jest warunek niezależności modułu elastyczności od głębokości indentacji. Zaletą stosowania tych modeli jest możliwość uwzględnienia kształtu indentera [22].

Innym modelem zakładającym jednorodność komórki, umożliwiając jednocześnie uwzględnienie jej lepkosprężystych właściwości, jest liniowy wiskoelastyczny model bryłowy (Rys. 26c). Komórka jest modelowana jako jednorodna bryła charakteryzująca się elastycznością oraz lepkością. Równanie dla tego modelu przyjmuje postać:

$$\tau_{ij} + \frac{\eta}{e_2} \dot{\tau}_{ij} = e_1 \gamma_{ij} + \eta \left(1 + \frac{e_1}{e_2}\right) \dot{\gamma}_{ij} \quad (4)$$

gdzie: τ_{ij} - chwilowe naprężenie przyłożone w danym punkcie obiektu,

e_1, e_2 – stałe elastyczności,

η - stała lepkościowa,

γ_{ij} - chwilowe napięcie w danym punkcie obiektu,

$\dot{\tau}_{ij}, \dot{\gamma}_{ij}$ - wartości średnie dla danego punktu.

Powyższe modele, opisując komórkę jako jednorodny obiekt, całkowicie pomijają budowę komórki, której błona oraz jądro charakteryzują się znacząco innymi właściwościami niż cytoplazma, która jednakże również nie jednorodna. Potraktowanie komórki jako materiału zbudowanego ze stałych, elastycznych elementów oraz z płynu charakteryzującego się określoną lepkością doprowadziło do utworzenia modelu dwufazowego (Rys. 26d). Matematycznie model ten opisują dwa równania, jedno odnoszące się do fazy stałej (s):

$$\boldsymbol{\sigma}^s = -\Phi^s p \mathbf{I} + \Lambda_s \text{tr}(\boldsymbol{\varepsilon}) \mathbf{I} + 2M_s \boldsymbol{\varepsilon} \quad (5)$$

a drugie do fazy płynnej (f):

$$\boldsymbol{\sigma}^f = -\Phi^f p \mathbf{I} \quad (6)$$

gdzie: $\boldsymbol{\sigma}$ - tensor naprężeń Cauchy'ego ważny w kontekście wyznaczenia wektora naprężenia

Φ - objętość frakcji odpowiednio stałej (s) lub ciekłej (f),

ρ - ciśnienie płynu,

\mathbf{I} - tensor identyczności (tożsamości),

M, Λ - stałe Lamego czyli stałe materiałowe materiału izotropowego, odpowiednio stałego (s) i ciekłego (f),

ϵ - nieskończenie mały tensor odkształcenia Cauchy'ego [196],[194].

Istnieje również wiele bardziej skomplikowanych modeli, które uwzględniają obecność poszczególnych elementów komórki. Prowadzone symulacje wykazują, że jądro komórkowe ma znaczący wpływ na elastyczność całej komórki. W celu przedstawienia tej zależności, komórkę można przedstawić jako hiperelastyczny obiekt o długości 1000 nm i wysokości 255 nm, umieszczony na sztywnym podłożu i indentowany sztywnym, sferycznym próbnikiem. Wewnątrz komórki umieszczone jest sferyczne, elastyczne jądro o średnicy 100 nm. Do opisu jądra oraz elementów sztywnych wykorzystano model elastyczny, natomiast hiperelastyczna cytoplazma opisana została prawem Neo-Hook'a. W obydwu modelach rzeczywiste naprężenie Cauchy'ego σ dane jest wzorem:

$$\sigma = \sigma_{PK}(\mathbf{I} + \nabla r) \quad (7)$$

gdzie: σ_{PK} - drugie naprężenie Pikola-Kirchoffa w konfiguracji odniesienia,

\mathbf{I} - tensor identyczności (tożsamości),

∇r – gradient przemieszczenia. Podczas gdy naprężenie Pikola-Kirchoffa w modelu elastycznym jest opisane jako zależne od tensora deformacji Cauchy'ego-Greena, wektora rozszerzalności cieplnej oraz temperatury, w przypadku modelu hiperelastycznego wykazuje ono zależność od funkcji energii odkształcenia [197].

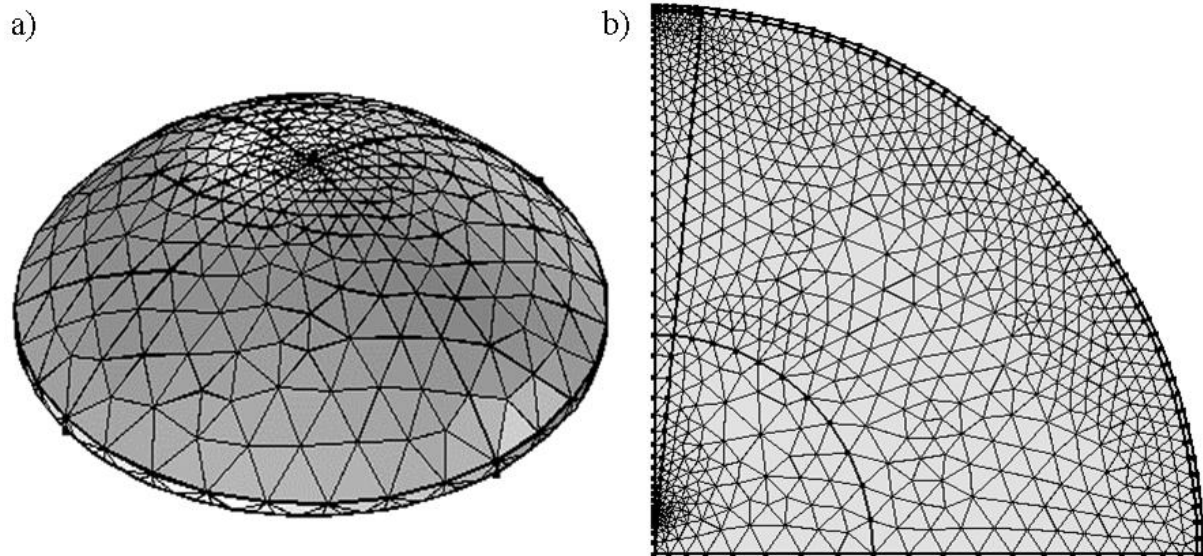
Uwzględnienie większej liczby elementów komórki, pozwala na zamodelowanie większej liczby właściwości. Model, w którym komórka posiada elastyczną błonę komórkową, cytoszkielet utworzony z lepkosprężystych elementów oraz zbudowane z lepkosprężystych elementów jądro pozwala na symulację zarówno morfologii komórki i jej wewnątrzkomórkowej budowy, jak również wzrostu, podziału czy też ruchu. Ponadto podzielenie błony komórkowej na segmenty umożliwia obserwację oddziaływania komórki z otoczeniem i innymi komórkami [198].

Ważnym elementem komórki jest korteks komórkowy. Jest on zbudowany z filamentów aktynowych, które tworzą sieć znajdującą się bezpośrednio pod błoną komórkową. Korteks ma duże znaczenie w podziale, migracji oraz różnicowaniu komórek [199]. Ponadto odpowiada on za napięcie komórki, w istotny sposób wpływając na właściwości mechaniczne komórki [200]. Za mechaniczną aktywność korteksu odpowiadają między innymi miozyna (białko) oraz czynniki kontrolujące polimeryzację aktyny. Zmiany w korteksie można zaobserwować m.in. w komórkach nowotworowych, które cechują się spadkiem sztywności [199]. Pomimo znaczenia korteksu, ten element komórki nie jest powszechnie uwzględniany podczas modelowaniu indentacji komórek.

6.2. Metoda elementów skończonych

Rozwiązania modeli matematycznych, które pozwolą m.in. na zobrazowanie deformacji czy rozkładu sił podczas indentacji wymagają zastosowania metod obliczeniowych. Jedną z możliwości jest zastosowanie modelu elementu subkomórkowego (SEM*, ang. *Subcellular Element Model*), w którym komórka jest złożona z tysięcy fragmentów powiązanych krótkozasięgowymi oddziaływaniami wiskoelastycznymi. Metoda ta pozwala na analizę trójwymiarowych układów składających się z wielu komórek o określonym kształcie [201]. Najczęściej w modelowaniu indentacji przy użyciu AFM wykorzystuje się metodę elementów skończonych. W metodzie FEM obszar komórki dzielony w procesie tzw. dyskretyzacji na wiele podobszarów, o wybranym kształcie, liczbie oraz gęstości upakowania elementów (Rys. 27). Każdy z elementów, o prostej, ułatwiającej obliczenia geometrii jest opisany funkcjami różniczkowymi charakteryzującymi jego stan fizyczny. Technika FEM umożliwia więc modelowanie obiektów o skomplikowanym kształcie. Większa liczba elementów pozwala na otrzymanie dokładniejszych wyników, wymagając jednakże większej mocy obliczeniowej [202]. Zastosowanie metody elementów skończonych umożliwia określenie wpływu elementów strukturalnych komórki na jej stabilizację [203], sztywność [204], a także pozwala uzależnić jej zachowanie od głębokości indentacji [205-206] oraz rozmiaru [207] i kształtu użytego próbnika [192]. FEM umożliwia ponadto wyznaczenie napięcia powierzchniowego [207] oraz ciśnienia turgorowego będącego odpowiedzią ściany komórkowej komórki roślinnej na nacisk [206,208]. Symulacje FEM pozwalają jednak nie tylko na analizę geometrycznych i mechanicznych właściwości komórki, ale również biochemicznych sygnałów [209] i kinetyki reakcji oraz dyfuzji [210], umożliwiając śledzenie ruchliwości komórki.

Technika FEM może stanowić wsparcie technik eksperymentalnych potwierdzając uzyskiwane dane [211], pozwalając jednocześnie na przewidywanie przebiegu krzywych siłowych uzyskiwanych przy różnych parametrach indentacji [207,212].



Rysunek 27. Dyskretyzacja obszaru modelowanej komórki: a) siatka na powierzchni komórki, b) siatka w przekroju komórki. Rozmiar elementów zmniejsza się w obszarze kontaktu z próbnikiem, zwiększając tym samym gęstość upakowania elementów siatki.

7. Część doświadczalna

7.1. Materiały badawczy

Materiał badawczy stanowiły tkanki pobierane od pacjentek Oddziału Klinicznego Endokrynologii Ginekologicznej i Ginekologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, podczas planowo przeprowadzanych zabiegów. Analizy właściwości mechanicznych wykonano w Instytucie Katalizy i Fizykochemii Powierzchni im. Jerzego Habera Polskiej Akademii Nauk. Badania zostały przeprowadzone za zgodą Komisji Bioetycznej na podstawie opinii nr 1072.6120.180.2019 z dnia 27.06.2019.

Do badania zostały zakwalifikowane pacjentki w wieku od 27 do 64 lat, przy czym wiek 13 z 17 pacjentek wynosił poniżej 40 lat. Warunkiem koniecznym udziału w badaniu było wyrażenie pisemnej zgody na pozyskanie fragmentu endometrium do badania. Pacjentki podzielono na dwie grupy: grupę pacjentek płodnych, które posiadają naturalnie poczęte potomstwo oraz grupę pacjentek niepłodnych, nieposiadających potomstwa. Wśród pacjentek niepłodnych wyszczególniono niepłodność pierwotną, a także poronienia nawykowe. Dodatkowo wyróżniono jedną pacjentkę z niepłodnością wtórną jako niepłodną, ale w przeszłości posiadającą potomstwo. Ze względu na zmiany patologiczne stwierdzone w wyniku badania histopatologicznego przeprowadzonego w Zakładzie Patomorfologii Szpitala Uniwersyteckiego w Krakowie, w obrębie macicy wyróżniono grupę pacjentek z polipami oraz grupę pacjentek z innymi, niepolipowatymi zmianami. Z uwagi na uzyskane wyniki z grupy pacjentek z polipami wyodrębniono grupę z mikropolipami. Charakterystyka pacjentek biorących udział w badaniu została przedstawiona w tabeli 4.

Próbki do badania pobierano techniką biopsji aspiracyjnej. Z pobranej tkanki uzyskiwano fragment przekazywany do badania histopatologicznego w celach diagnostycznych. Pozostały materiał dzielono na dwie części i umieszczano w probówkach Eppendorfa. Probówki wypełniano zrównoważonym roztworem soli Hanka (HBSS, ang. *Hanks' Balanced Salt Solution*), niezawierającym jonów wapnia Ca^{2+} , jonów magnezu Mg^{2+} oraz czerwieni fenolowej (barwnika). HBSS jest powszechnie stosowanym w hodowlach komórkowych roztworem soli, pozwalającym na utrzymanie fizjologicznego pH oraz ciśnienia osmotycznego próbki. Eppendorfy z próbkami mrożono w temperaturze -80°C i w tej postaci przewożono do Instytutu Katalizy i Fizykochemii Powierzchni. Próbki rozmrażano w temperaturze pokojowej

bezpośrednio przed pomiarem. Fragment tkanki przyklejano do polistyrenowej szalki Petriego przy pomocy kleju cyjanoakrylanowego. W celu zapewnienia podczas pomiaru środowiska bliskiego rzeczywistemu otoczeniu tkanki, a także aby uniknąć wysuszenia próbki, szalkę wypełniano roztworem HBSS w ilości niezbędnej do całkowitego zanurzenia próbki i głowicy pomiarowej. Pomiary prowadzono w temperaturze pokojowej.

Tabela 4. Charakterystyka pacjentek włączonych do badania

Grupa	Pacjentka	Zdiagnozowana zmiana	Płodność
Inne zmiany	p1	Metaplazja endometrium	Płodna
	p8	Adenomioza	Płodna
	p10	Zrost pokrywający ujście maciczne	Niepłodność pierwotna
	p18	Loża w bliźnie po cc	Niepłodność wtórna
	p20	Loża w bliźnie po cc	Płodna
Polipy	p3	Polipowato uformowana błona	Poronienia nawykowe
	p4	Polipowato uformowana błona	Niepłodność pierwotna
	p5	Polip endometrium	Niepłodność pierwotna
	p7	Polip endometrium	Niepotwierdzona
	p9	Polip endometrium	Niepłodność pierwotna
	p12	Polip endometrium	Niepłodność pierwotna
	p13	Polip trzonu macicy	Płodna
	p14	Polip endometrium	Płodna
	p21	Polip endometrium	Niepotwierdzona
Mikro-polipy	p11	Mikropolipy	Poronienia nawykowe
	p19	Adenomioza, w przeszłości mikropolipy	Niepłodność pierwotna
	p24	Loża w bliźnie po cc, polip i mikropolipy	Płodna

7.2. Metody badań

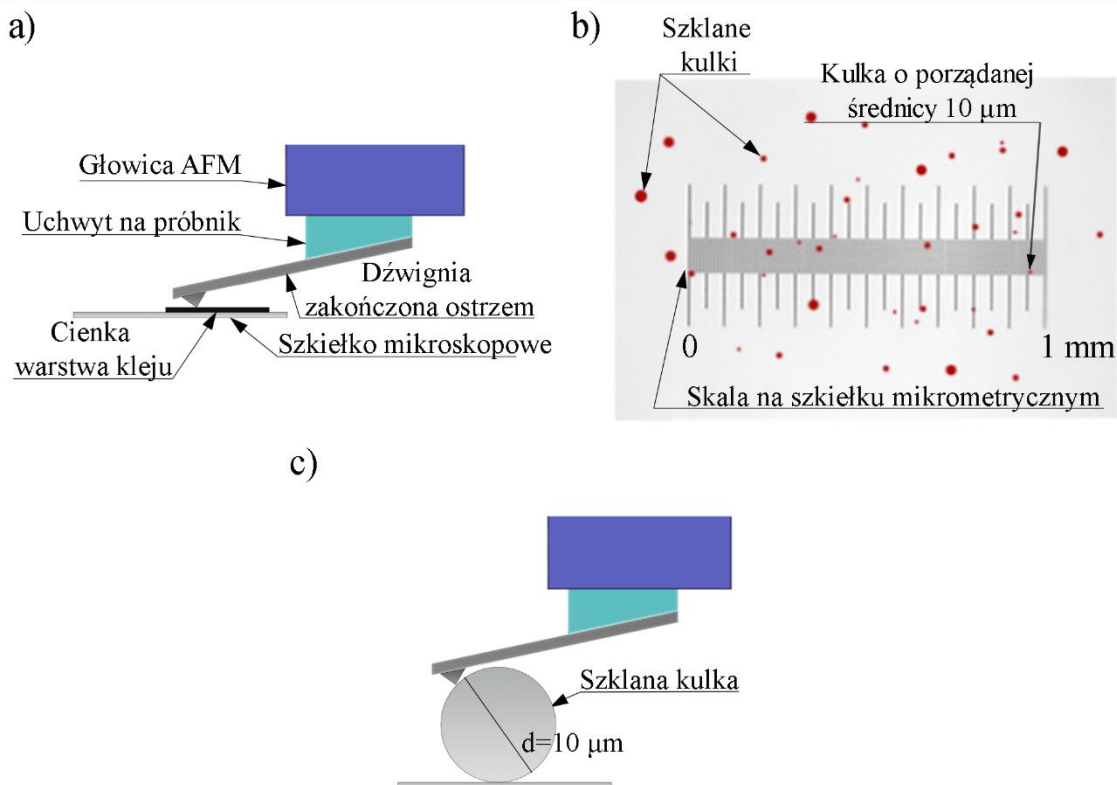
Pomiary właściwości mechanicznych tkanek, w szczególności modułu Younga wykonano przy użyciu mikroskopu sił atomowych Ntgra Vita NT-MDT z odwróconym mikroskopem optycznym Olympus, model IX71. Zastosowano dwa rodzaje próbników. Pierwszy z nich stanowiło krzemowe ostrze o kształcie ściętej piramidy, nazywane dalej ostrzem. W tym celu wykorzystano komercyjnie dostępne próbki CSG01 z serii Golden Silicon firmy NT-MDT. Do tego typu próbników przyklejano, przy pomocy dwuskładnikowego kleju epoksydowego, szklane kulki o średnicy o 3 rzędy wielkości

większej od promienia krzywizny ostrza. Otrzymywano w ten sposób drugi typ indentera, określany dalej jako kulka. Rezonansowa częstotliwość własna dźwigni oraz związana z nią stała siłowa stanowią wielkość warunkującą zastosowanie danego próbnika w analizie próbek o określonej sztywności. Wartość częstotliwości do jakiej wzbudza się dźwignia z ostrzem pomiarowym wynika m.in. z długości dźwigni oraz jej masy. Przyklejenie kulki o stosunkowo dużej masie znacząco zmienia masę próbnika. Jednocześnie nawet niewielka ilość użytego kleju ma wpływ na elastyczność dźwigni. Na podstawie wyznaczonej dla każdego próbnika częstotliwości rezonansowej stwierdzono, że przyklejenie kulki prowadzi do zmiany jego właściwości, jednak różnica ta nie wpływa znacząco na możliwość zastosowania otrzymanych indenterów w analizie miękkiej tkanki. Wybrane parametry stosowanych próbników przedstawiono w tabeli 5. Podczas pomiaru w środowisku ciekłym, przy przejściu pomiędzy ośrodkami, wiązka laserowa odbijająca się od dźwigni ulega załamaniu. Aby zniwelować ten efekt próbnik umieszczano na odpowiednio ściętym kryształ, zapewniając wymagany kąt nachylenia.

Tabela 5. Charakterystyka stosowanych próbników

	Ostrze	Kulka
Kształt próbnika	Ścięta piramida	Kulka
Parametr opisujący geometrię próbnika	Promień krzywizny ostrza: max 10 nm	Średnica: 10 μm
Długość dźwigni	350 μm	350 μm
Częstotliwość rezonansowa	11,88-20,10 kHz	6,76-11,88 kHz
Stała siłowa	0,08-0,16 N/m	0,03-0,08 N/m

Pomiary prowadzono z różnymi prędkościami skanowania, wynoszącymi 0,5; 1; 1,8 oraz 2 $\mu\text{m/s}$. Siłę nacisku z jaką ostrze pomiarowe dojeżdża do powierzchni próbki ustawiono, poprzez parametr setpoint, na poziomie 0,1-0,5. Dobór niskiej wartości setpoint miał na celu uniknięcie uszkodzenia próbnika, poprzez uniemożliwienie zbyt dużego zagłębienia ostrza w tkankę. Głowica pomiarowa może odsunąć ostrze od próbki o 1,8 μm . W przypadku próbek o nieregularnej strukturze powierzchniowej, do których należą tkanki, wysokość ta mogłaby być niewystarczająca, co prowadziłoby do braku możliwości oderwania ostrza od powierzchni próbki podczas pomiaru i tym samym do nieuzyskania prawidłowych krzywych. Krzywe siłowe rejestrowano przy pomocy oprogramowania Nova w wersji 1.1.0.1902 (2010).



Rysunek 28. Procedura przyklejania kulki do dźwigni próbnika. Próbnik umieszczony jest na głowicy AFM, jak podczas pomiarów, natomiast zbliżanie i oddalenie od powierzchni realizowane jest manualnie i kontrolowane za pomocą mikroskopu optycznego. Klejenie kulki przebiega według następujących etapów: a) Naniesienie minimalnej ilości kleju na końcówkę dźwigni, poprzez dotknięcie cienkiej warstwy kleju rozproszzonego na szkiełku mikroskopowym; b) Wybór kulki o pożądanym rozmiarze spośród kulek umieszczonych na szkiełku mikrometrowym z podziałką. Wybrana kulka musi być oddalona od pozostałych, aby uniknąć przypadkowego przyklejenia większej liczby kulek; c) Dotknięcie wybranej kulki dźwignią z klejem; d) Czas procedury klejenia jest ograniczony czasem zastygania kleju i wynosi maksymalnie 7 minut. Po przyklejeniu kulki i niewielkim odsunięciu głowicy konieczne jest pozostawienie próbnika w pozycji uniemożliwiającej jego uszkodzenie na czas ok. 5 minut.

Uzyskane krzywe opracowano przy użyciu programu atomicJ w wersji 1.7.2, umożliwiającego wyznaczenie właściwości skanowanych materiałów w oparciu o przebieg krzywych oraz parametrów własnych próbnika. 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 usztywniania próbki (Rys. 29) [213]. Parametrem definiowanym dla próbki jest współczynnik Poissona wynoszący 0,5. Próbniki scharakteryzowano przez wartość stałej siłowej oraz geometrię opisaną, w przypadku kulki, poprzez jej średnicę, natomiast

w przypadku ostrza kątem połówkowym oraz promieniem jego krzywizny. Dla krzywych uzyskanych przy pomocy kulki wykorzystano model sferyczny JKR (Johnson–Kendall–Roberts). Model ten jest rozwinięciem modelu Hertza i w przeciwieństwie do niego uwzględnia adhezję [214]. Opisuje on indentację sferycznym próbnikiem o promieniu R miękkiej i elastycznej próbki, charakteryzującej się modułem Younga E oraz współczynnikiem Poissona u . Przyłożona podczas indentacji siła F związana jest z modułem Younga wzorem:

$$F = 2a \frac{E}{1-u} \left(\delta - \frac{a^2}{3R} \right) \quad (8)$$

gdzie: a - promień kontaktu,

δ - głębokość indentacji [215]. Do analizy krzywych zarejestrowanych przy pomocy ostrza wykorzystano model indentacji piramidą o kącie połówkowym ostrza θ . Siła F w tym przypadku dana jest wzorem:

$$F = \frac{3}{4} \frac{E}{(1-u^2)} \tan\theta \delta^2 \quad [216]. \quad (9)$$

Czułość dla każdej serii krzywych (skanowanie w 25-100 punktach) wyznaczono jako nachylenie krzywej w obszarze maksymalnej deformacji próbki. Opracowanie uzyskanych danych, w szczególności wykonanie i analizę histogramów przeprowadzono stosując program SciDAVis. Dopasowanie rozkładu do otrzymanych wyników wykonano przy użyciu programu Statistica.

W modelowaniu komputerowym wykorzystano metodę elementów skończonych. Siatka wyznaczona w procesie dyskretyzacji została utworzona z elementów o kształcie czworościanu i charakteryzowała się większym zagęszczeniem elementów w obszarze styku próbki z powierzchnią komórki. W promieniu $0,7 \mu\text{m}$ od miejsca kontaktu ostrza z komórką krawędź elementu siatki wynosiła $0,12 \mu\text{m}$, natomiast w promieniu $1,6 \mu\text{m}$ dochodziła do $0,3 \mu\text{m}$. Zagęszczenie to zostało dobrane w oparciu o symulacje, zgodnie z którymi większe zagęszczenie siatki nie prowadziło do uzyskania istotnie zmienionych wyników. Próbnik został zamodelowany jako obiekt sferyczny, który oddziałuje z komórką bez udziału siły tarcia. W przeprowadzonych symulacjach sprawdzono zgodność uzyskanych wyników z modelem Hertza, w którym siłę deformacji podczas indentacji opisano wzorem:

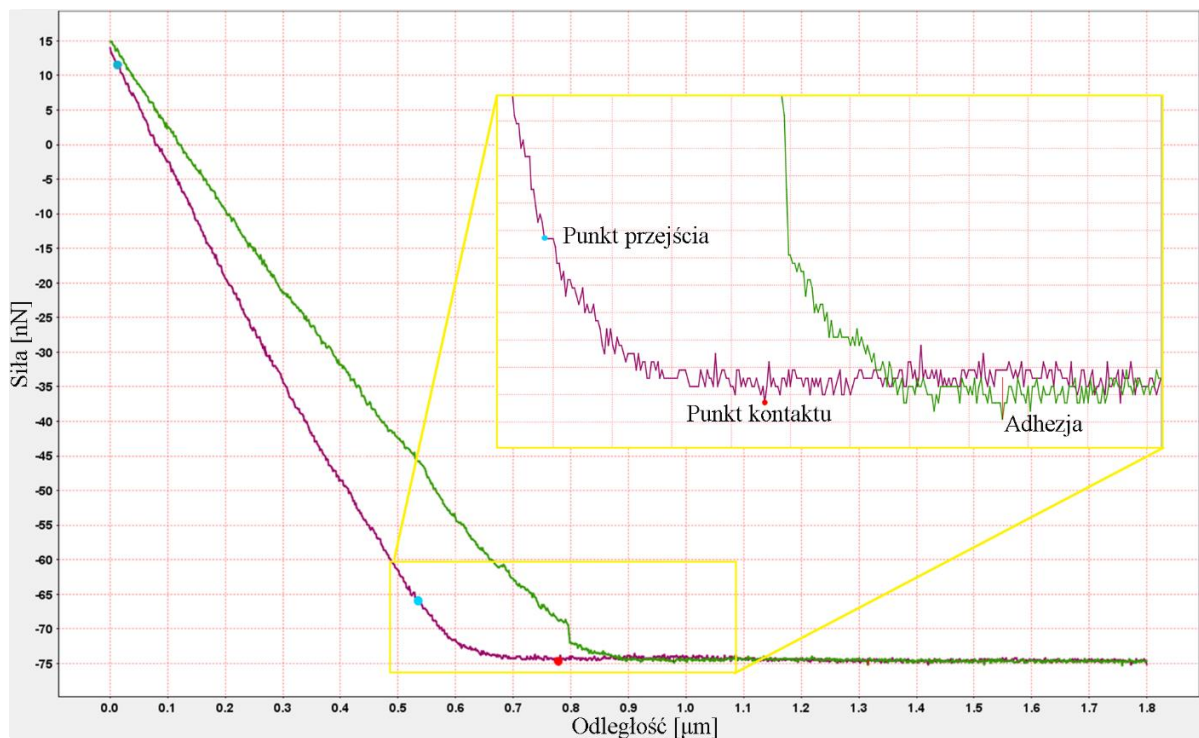
$$F = \frac{4}{3} \frac{E}{1-u^2} \sqrt{R} \delta^{3/2}, \quad (10)$$

gdzie: δ - głębokość indentacji,

u - współczynnik Poissona,

E - moduł Younga,

R - promień indentera, natomiast komórka traktowana jest jako obiekt płaski w miejscu indentacji, stąd też promień komórki został pominięty. Modelowanie przeprowadzono przy użyciu programu ANSYS Workbench. Do wykonania wykresów wykorzystano program Origin.

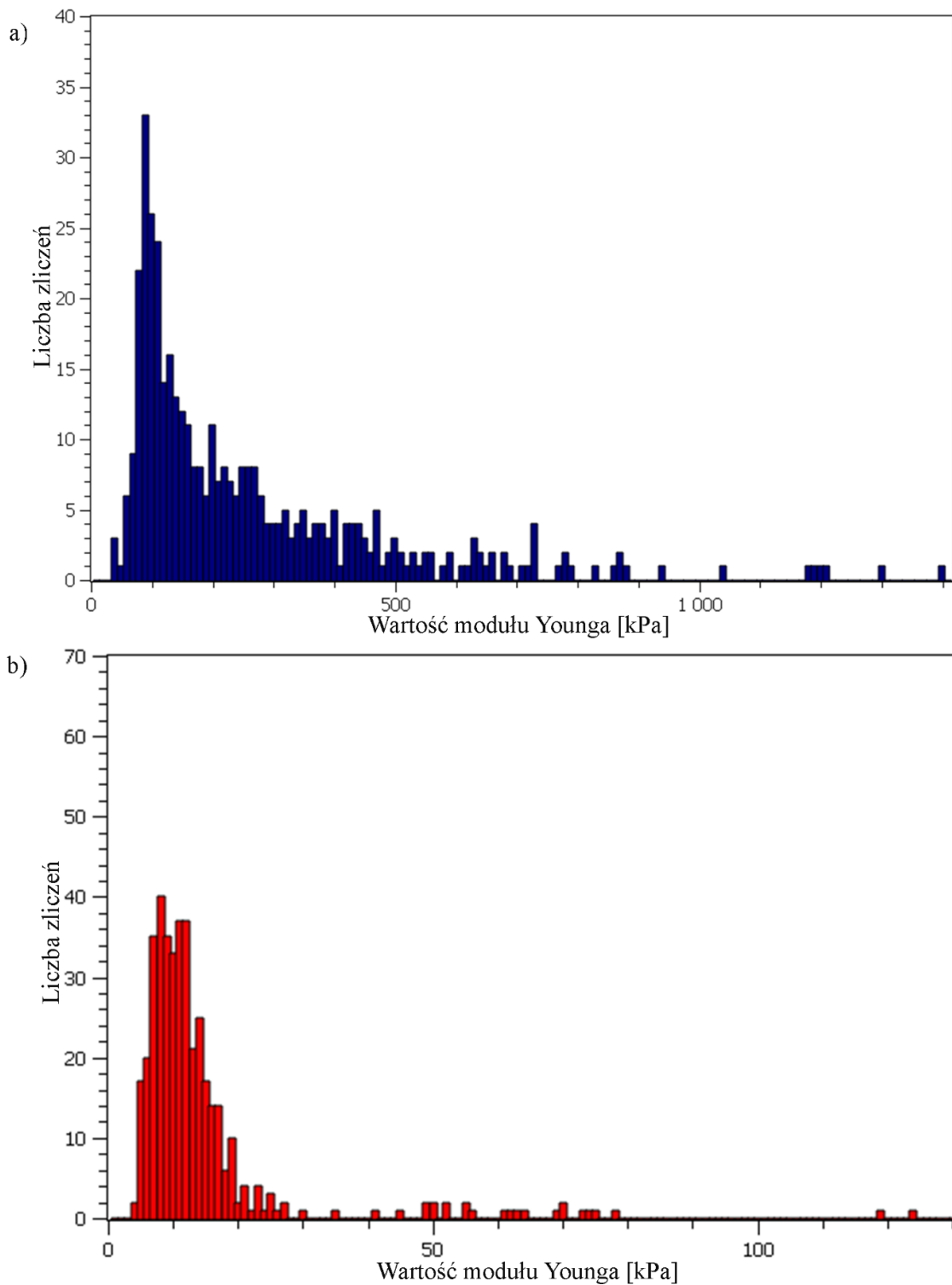


Rysunek 29. Przykład opracowania krzywej siłowej. Krzywa fioletowa: dojeżdżanie, krzywa zielona: odjeżdżanie, punkt czerwony: punkt kontaktu, punkt niebieski: punkt przejścia, czerwona linia pionowa: adhezja. Krzywa wykonana ostrzem dla pacjentki p1.

7.3. Wyniki badań i dyskusja

7.3.1. Spektroskopia sił tkanki

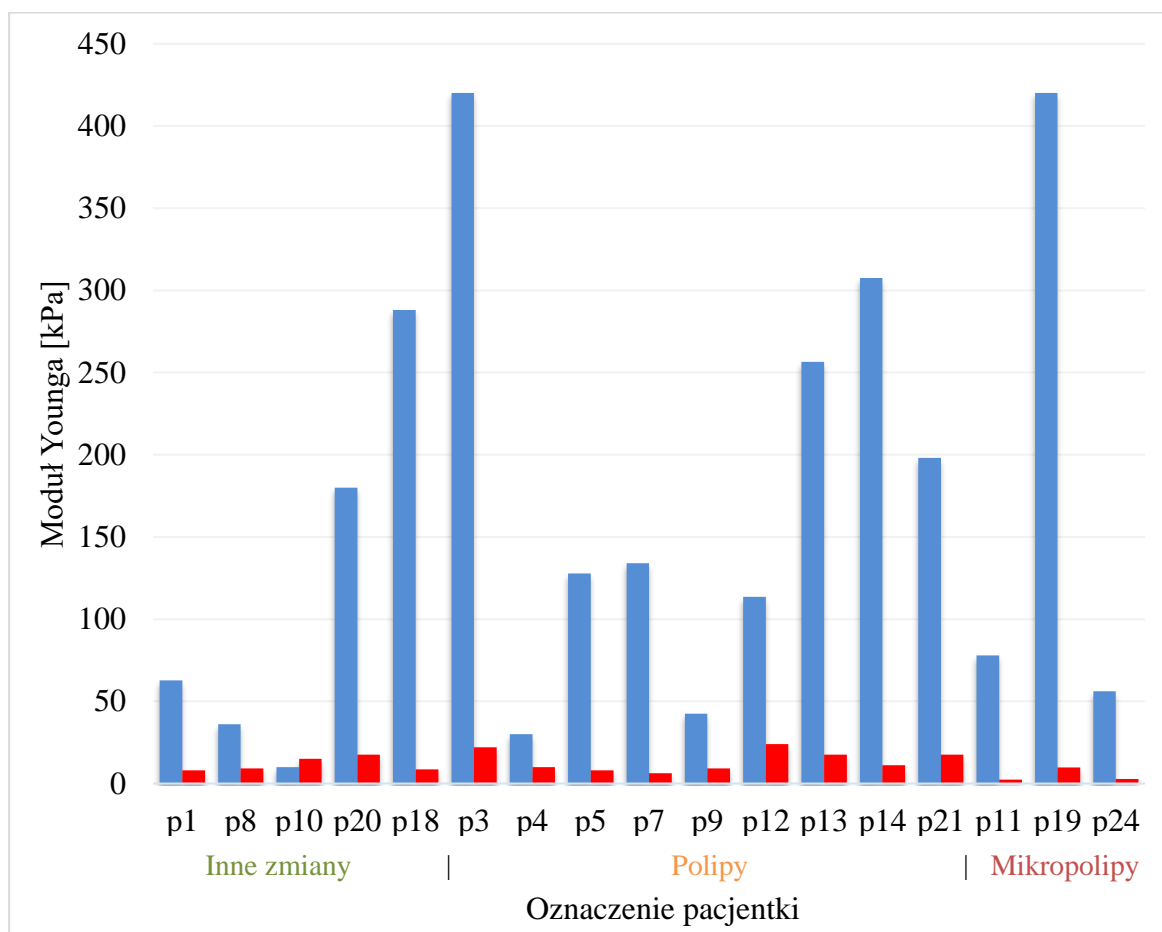
Moduły Younga wyznaczone w poszczególnych miejscach tkanki przyjmują wartości kilku do kilkuset kilopaskali. Uzyskane wyniki odpowiadają więc, co do rzędu wielkości, wartościom uzyskiwanym przez innych badaczy [26],[27],[28]. Wyznaczone dla każdej próbki dane przedstawiono w postaci histogramów (Rys. 30). Rozkład



Rysunek 30. Przykładowy histogram przedstawiający uzyskane wyniki: próbka p1, a) ostrze, b) kulka.

wyników może odpowiadać rozkładowi wartości ekstremalnej lub rozkładowi lognormalnemu. Jego cechą charakterystyczną jest tzw. ogon, wydłużający się wraz ze wzrostem liczby uwzględnionych wyników. Większość wyników zawiera się w pewnym

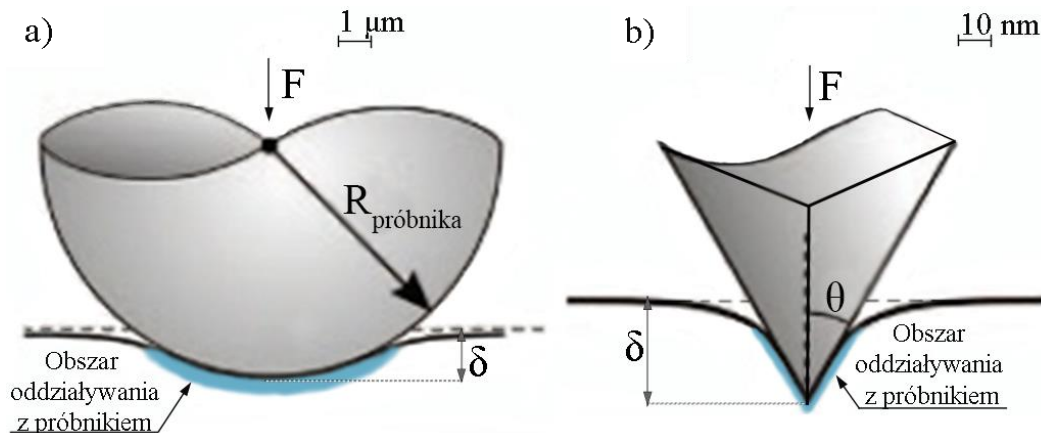
przedziale niskich wartości, natomiast ogon zawiera mniejszą liczbę wyższych wyników. Średnia w tego typu rozkładzie jest silnie związana z liczbą wyników dla których jest wyznaczana. Wraz ze wzrostem liczby danych wartość średniej przesuwa się w kierunku wyższych wartości. Wyznaczenie średniej dla tego rozkładu wiązałoby się z zawyżeniem jej wartości, dlatego dla otrzymanych danych nie przedstawiono danych statystycznych opartych na średniej. Z tego względu do analizy zostały użyte wartości wyznaczone dla maksimum histogramu. Uzyskany dla każdej pacjentki wynik, nazywany dalej modułem Younga E dla danej próbki, oznacza najczęściej uzyskiwaną podczas skanowania powierzchni wartość modułu Younga. Wyniki uzyskane przy pomocy ostrza (E_o) (Rys. 30a) charakteryzują się większym zróżnicowaniem w porównaniu z kulką (E_k) (Rys. 30b), dla której „ogon” dużych wartości jest znacząco krótszy.



Rysunek 31. Wartości modułu Younga wyznaczone przy pomocy ostrza i kulki dla poszczególnych próbek; kolor niebieski- ostrze, kolor czerwony- kulka.

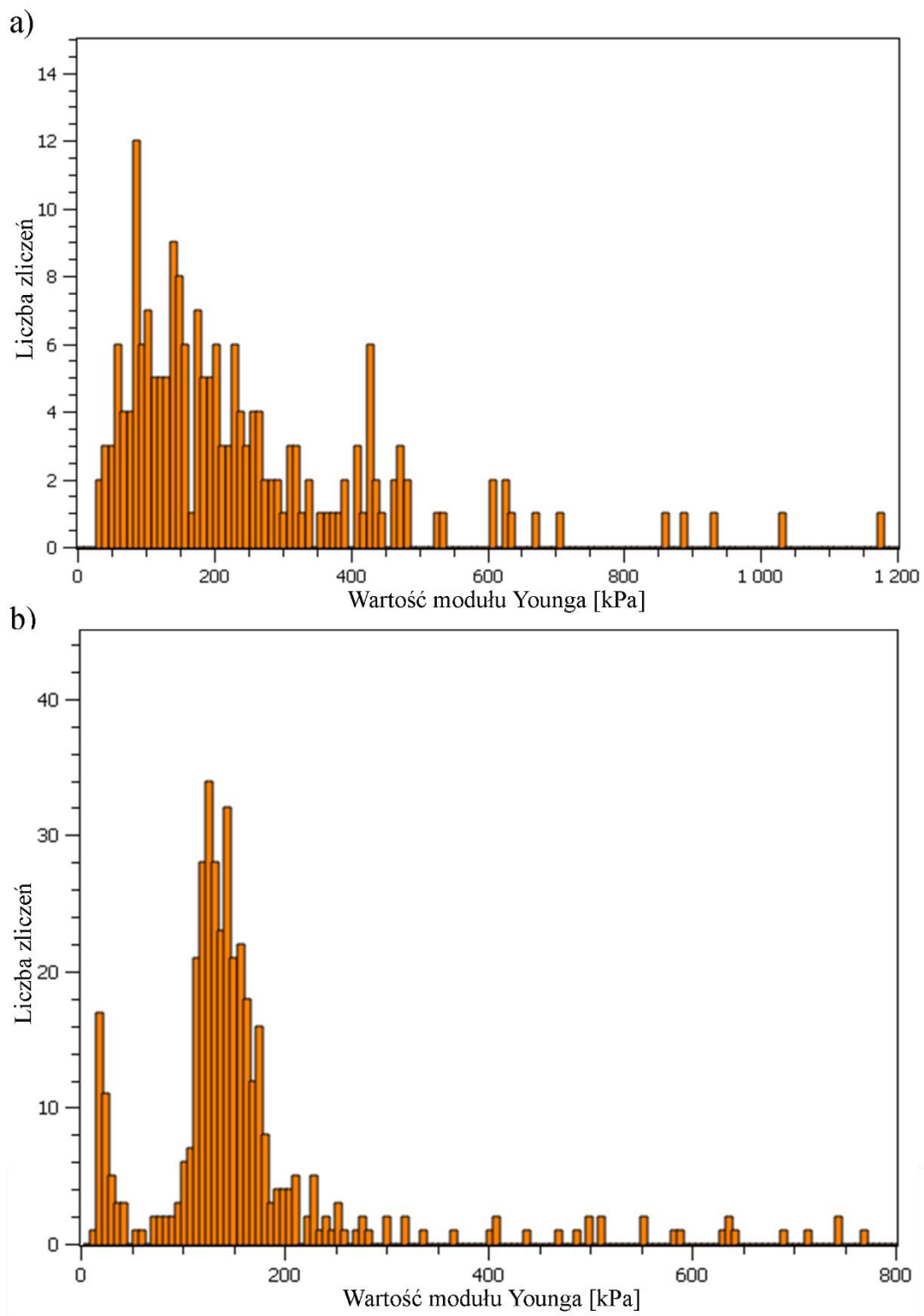
Wartości modułu Younga uzyskane przy użyciu ostrza oraz kulki zostały zaprezentowane graficznie na rysunku 31. Uzyskane przy pomocy ostrza wyniki są kilkukrotnie wyższe w porównaniu z odpowiadającymi im wartościami dla pomiarów kulką. Ponadto wyniki pomiarów prowadzonych ostrzem wykazują duży rozrzut wartości ($E_{\text{omin}}=10$ kPa, $E_{\text{omax}}=420$ kPa), podczas gdy wartości mierzone kulką są stosunkowo jednorodne ($E_{\text{kmin}}=2,3$ kPa, $E_{\text{kmax}}=24$ kPa). Chociaż prezentowane dane pozwalają na zaobserwowanie wpływu kształtu próbnika na uzyskiwane wartości modułu Younga, nie umożliwiają one zaobserwowania różnic pomiędzy grupami badawczymi.

Pomiar prowadzony przy pomocy dużej, w stosunku do wielkości elementów tworzących strukturę tkanki, średnicy dostarcza informacji o globalnej elastyczności tkanki (Rys. 32a). Indentacja próbki przy pomocy ostrza o znacznie mniejszym promieniu krzywizny w porównaniu z promieniem kulki pozwala na punktowe wyznaczenie właściwości materiału, co umożliwia rejestrację różnic pomiędzy położonymi blisko siebie punktami, które zostają pominięte podczas pomiaru kulką (Rys. 32b). Wyjaśnia to większe zróżnicowanie wyników uzyskiwanych ostrzem, zarówno w obrębie jednej tkanki, jak również pomiędzy próbkami.

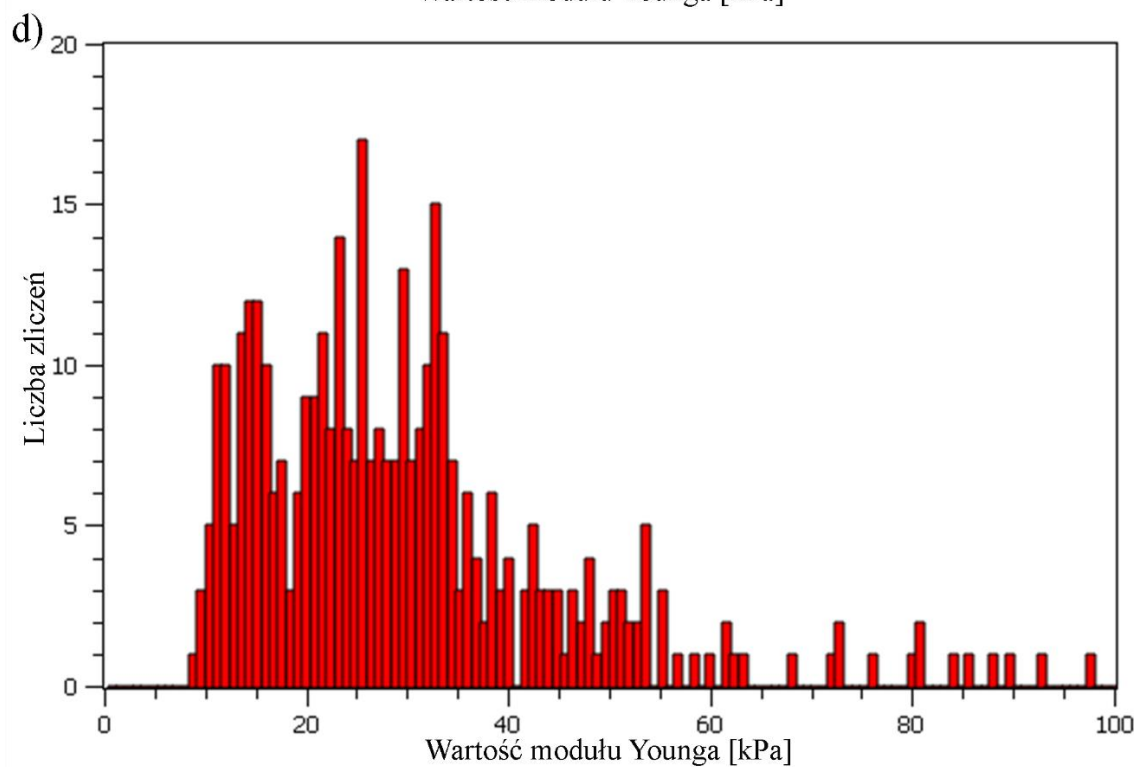
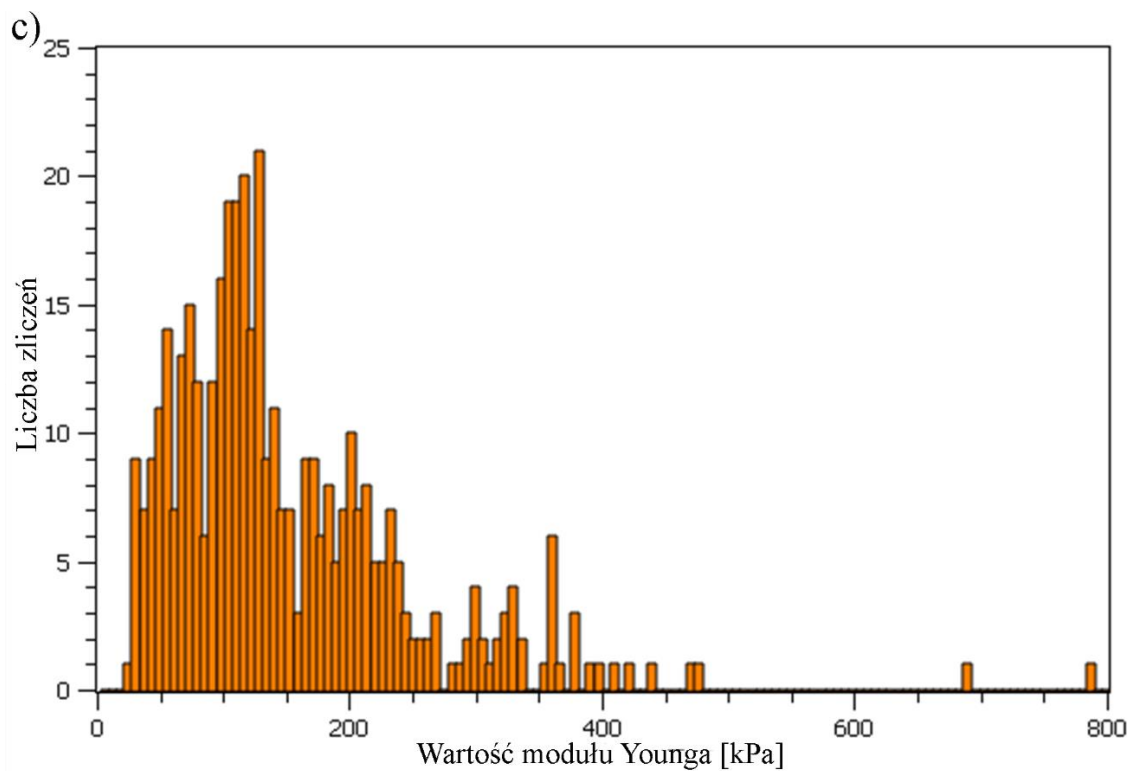


Rysunek 32. Schemat pomiaru kulką oraz ostrzem o kształcie piramidy. Powierzchnia kontaktu próbnika z próbką jest znacznie większa w przypadku pomiaru kulką (a), natomiast głębokość indentacji jest większa w przypadku ostrza o kształcie piramidy. Na podstawie: [217].

W przypadku pomiarów prowadzonych przy pomocy ostrza dla próbek od pacjentek z polipami oraz mikropolipami uzyskane wyniki nie zawsze przyjmują rozkład zbliżony do przedstawionego na rysunku 30. W niektórych rozkładach można zaobserwować występowanie większej liczby pików będących lokalnymi maksimumi



Rysunek 33 Histogramy obrazujące niejednorodność analizowanych tkanek u pacjentek z polipowato uformowaną błoną: a) p3, oraz polipem b) p12.



Rysunek 33. Histogramy obrazujące niejednorodność analizowanych tkanek u pacjentek z polipem: c) p21 oraz mikropolipami d) p24.

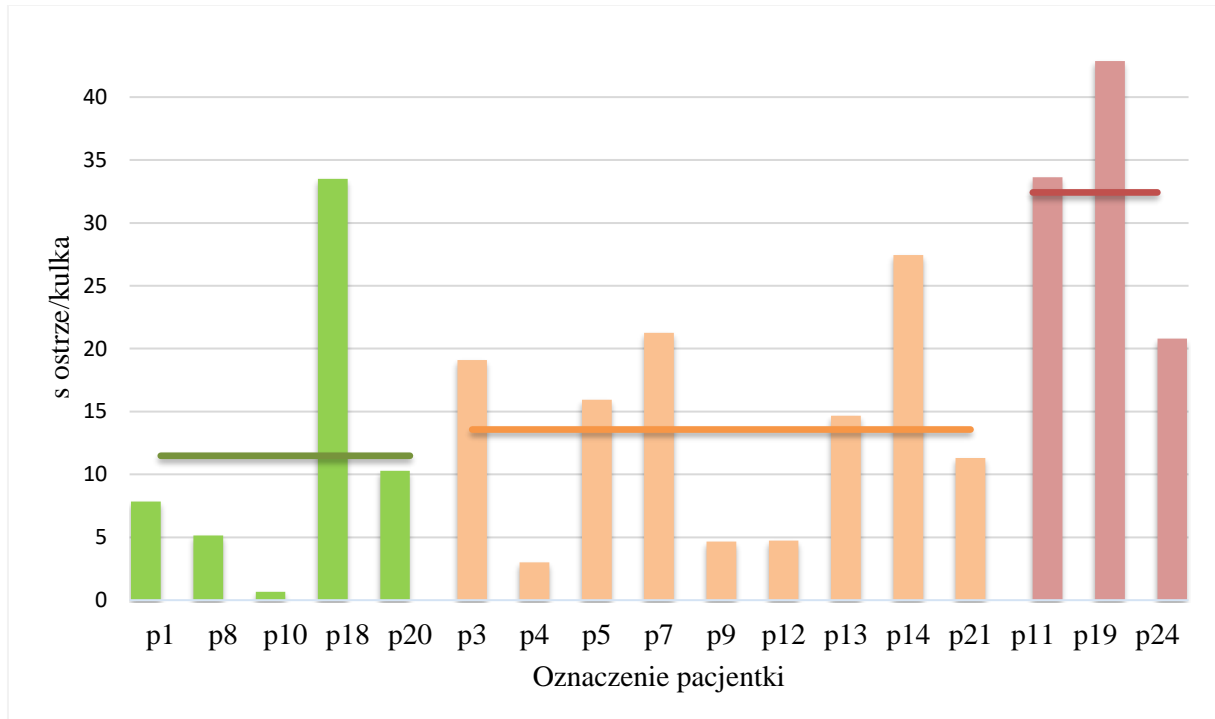
histogramu. Rozkłady mogą przyjmować postać dwóch dobrze rozdzielonych pików, jak w przypadku pacjentek p3 (Rys. 33a) lub p12 (Rys. 33b) lub być gorzej rozdzielone jak w przypadku pacjentki p21 (Rys. 33c). W kontekście obecności polipów pik przy niższych wartościach modułu Younga interpretować można jako pochodzący od zdrowej tkanki, natomiast pik przy wyższych wartościach jako sztywność tkanki zmienionej przez polipa. Rozkład wyników dla pacjentki p24 ze zdiagnozowanymi mikropolipami charakteryzuje się dużą niejednorodnością (Rys. 33d). Histogram ten jest prawdopodobnie złożony z większej liczby pików, które można zinterpretować jako wartości dla tkanki zdrowej oraz zmienionej przez polipy w różnym stadium rozwoju.

W celu zaobserwowania różnic pomiędzy badanymi grupami wyznaczono wartość stosunku modułu Younga wyznaczonego przy pomocy ostrza do wielkości uzyskanej przy pomocy kulki. 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. Otrzymane w ten sposób wartości wielkości nazywanej dalej stosunkiem (s) ostrze/kulka przedstawiono na rysunku 34. Zastosowane przekształcenie doprowadziło do uzyskania danych wskazujących na istnienie znaczących różnic pomiędzy analizowanymi grupami. Uwzględniając wszystkie otrzymane wyniki uzyskano następujące średnie: dla grupy z innymi zmianami $\bar{s}_i=11,48339$, dla grupy z polipami $\bar{s}_p=13,569268$, oraz dla grupy z mikropolipami $\bar{s}_m=32,42162$.

W obrębie grupy z innymi zmianami zaobserwowano znacznie odbiegający od pozostałych wynik ($s_{p18}=33,48837$) dla pacjentki p18. U kobiety tej, podobnie jak u pacjentki p20 zdiagnozowano niszę po cesarskim cięciu, jednak wynik dla pacjentki p20 jest trzykrotnie niższy ($s_{p20}=10,28571$). Powodem tej rozbieżności może być pobranie od pacjentki p18 podczas zabiegu biopsji fragmentu bezpośrednio ze zrostu. Zwłókniony obszar zrostu charakteryzuje się mniejszą elastycznością, co tłumaczy duży wzrost wartości modułu Younga. W średniej dla grupy pacjentek z niepolipowatymi zmianami pominięto wartość dla próbki p18 otrzymując wynik $\bar{s}_i=5,982143.6$

W grupie pacjentek z polipami znajdują się dwie kobiety (p3 oraz p4) z polipowato uformowaną błoną. Wyniki uzyskane dla pobranych od nich próbek różnią się znacząco i podczas gdy stosunek ostrze/kulka dla pacjentki p3 odpowiada wartościom uzyskiwanym dla polipów, w przypadku próbki p4 wyznaczona wartość jest znacząco

niższa i można by ją przypisać do grupy niepolipowatych zmian. Obserwację tę można zinterpretować uwzględniając, że obecność polipowato uformowanej błony oznacza występowanie ognisk polipa, bez zdefiniowania stopnia zaawansowania jego rozwoju. Przepuszczalnie u pacjentki p3 rozwój polipa jest na tyle zaawansowany, że doszło już do zmiany elastyczności tkanki, czego nie zaobserwowano jeszcze u pacjentki p4.

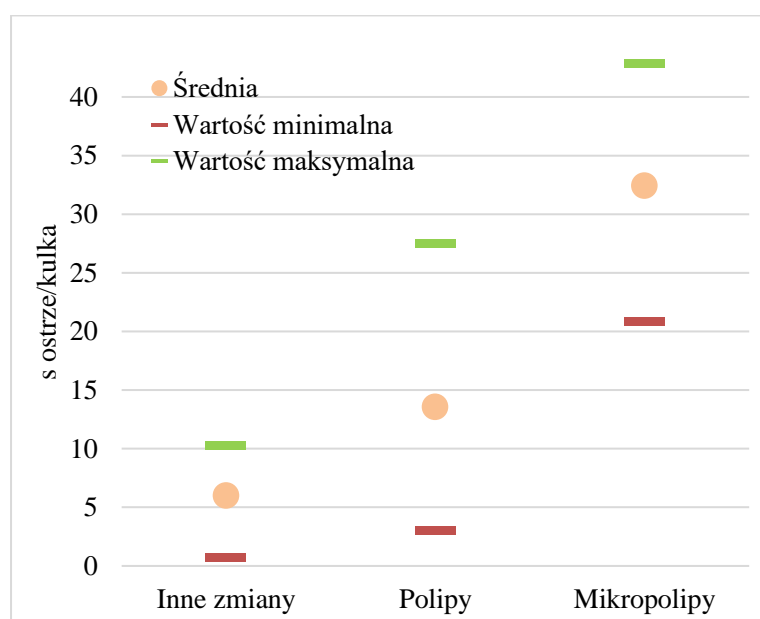


Rysunek 34. Stosunek ostrze/kulka wartości modułu Younga dla grupy pacjentek z niepolipowatymi zmianami (słupki zielone), pacjentek z polipami (słupki pomarańczowe) oraz pacjentek z mikropolipami (słupki czerwone). Linie oznaczają średnią wartość odpowiednio dla grupy innych zmian (zielona), polipów (pomarańczowa) i mikropolipów (czerwona).

Pacjentka p19 była początkowo zakwalifikowana do grupy innych zmian w obrębie macicy, gdyż w wyniku przeprowadzonego badania histopatologicznego zdiagnozowano u niej adenomiozę. Uzyskany podczas pomiarów spektroskopii sił wynik znacząco odbiegał zarówno od wartości uzyskiwanych dla zmian niepolipowatych jak również dla polipów. W celu wyjaśnienia otrzymanego wyniku przeanalizowano historię choroby pacjentki. W wywiadzie pacjentka wymieniła trzykrotne usuwane mikropolipy (w 2018 oraz dwukrotnie w 2019 roku). Chociaż w badaniu histopatologicznym nie stwierdzono występowania mikropolipów ani polipów, pod względem mechaniki tkanka wykazywała właściwości odpowiadające mikropolipom. Uzyskany wynik sugeruje, że tkanka mogła nie wrócić do pierwotnych właściwości pomimo usunięcia mikropolipów,

bądź powstały nowe ogniska na tyle małe, że nie były widoczne w badaniu histopatologicznym.

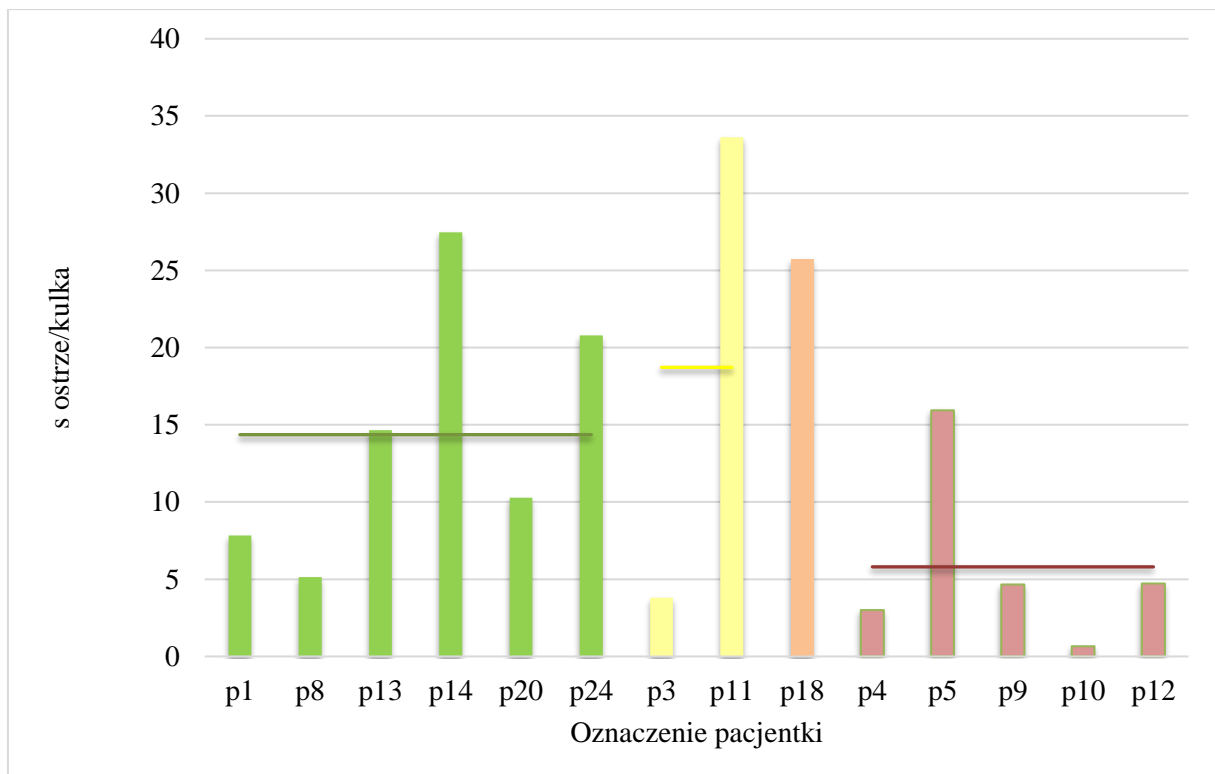
Średnie stosunki ostrze/kulka dla grup badawczych przedstawiono graficznie na rysunku 35., w przypadku grupy innych zmian pomijając pacjentkę p18. Na wykresie zaznaczano również najniższy i najwyższy wynik uzyskany w każdej z grup. Średnia wartość stosunku ostrze/kulka jest najniższa w przypadku grupy pacjentek ze zmianami niepolipowatymi. Dla grupy pacjentek z polipami średnia ta jest w przybliżeniu dwukrotnie, natomiast w przypadku mikropolipów pięciokrotnie wyższa niż w przypadku grupy innych zmian w obrębie macicy.



Rysunek 35. Średni stosunek ostrze/kulka wraz z minimalnym i maksymalnym wynikiem uzyskany dla poszczególnych grup. W grupie innych zmian pominięto próbkę p18.

Wartości modułu Younga przeanalizowano także w kontekście płodności pacjentek. Wykres uzyskanych wyników w grupach wyróżnionych w oparciu o płodność przedstawiono na rysunku 36. Średni stosunek ostrze/kulka w grupie pacjentek płodnych wynosi $\bar{s}_{\text{płodne}}=14,36024$. W grupie poronień nawykowych średnia wartość s wynosi $\bar{s}_{\text{poronienia}}=18,719436$, natomiast wartość s ostrze/kulka dla pacjentki z niepłodnością wtórną jest równa $s_{\text{wtórna}}=25,714286$. Średni stosunek ostrze kulka w grupie pacjentek z niepłodnością pierwotną wynosi $\bar{s}_{\text{pierwotna}}=11,976615$. Do tej grupy należy jednak pacjentka p19 u której zdiagnozowano adenomiozę, a w przeszłości usuwano mikropolipy i, pomimo tych zabiegów, jej endometrium wykazuje właściwości

charakterystyczne dla mikropolipów. Wysoka wartość s dla tej pacjentki znacząco podnosi średnią. Pominięcie tego wyniku skutkuje uzyskaniem wartości średniego s , wynoszącej $\bar{s}_{\text{pierwotna}}=5,8005095$. Średni stosunek ostrze/kulka dla pacjentek z niepłodnością pierwotną jest więc ponad dwukrotnie niższy niż w pozostałych grupach. Z uwagi na niewielką liczbę przebadanych próbek, szczególnie w grupie z niepłodnością wtórną, oraz biorąc po uwagę duże zróżnicowanie pod względem zdiagnozowanych zmian patologicznych włączonych do badania pacjentek, prezentowane wyniki nie pozwalają na jednoznaczną interpretację. Utrudnienie stanowi również definicja płodności, zgodnie z którą pacjentki posiadające naturalnie poczęte potomstwo są klasyfikowane jako płodne, chyba że istnieją podstawy do stwierdzenia niepłodności wtórnej. Z tego względu do grupy pacjentek płodnych zaliczone zostają posiadające dzieci pacjentki z polipami, które rozwinęły się najprawdopodobniej już po urodzeniu dzieci. Polipy stanowią jedną z przyczyn ograniczenia płodności, stąd też płodność tych kobiet pozostaje niepewna. Otrzymane wyniki stanowią jednak podstawę, aby przypuszczać, że istnieje związek wartości modułu Younga z płodnością.

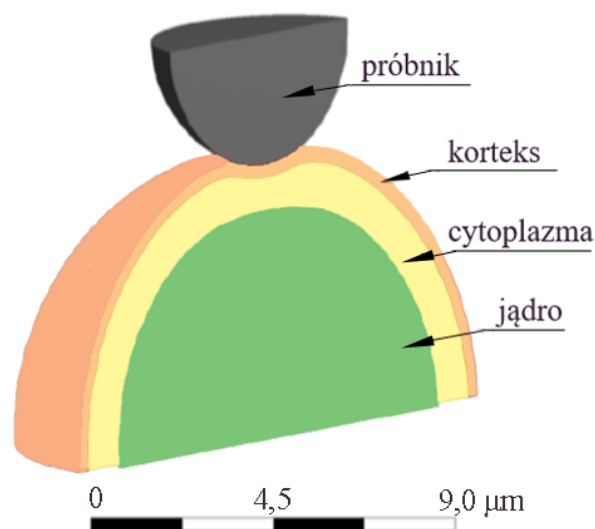


Rysunek 36. Stosunek ostrze/ kulka w zależności od płodności pacjentek: grupa pacjentek płodnych (słupki zielone), pacjentki po poronieniach nawykowych (słupki żółte), pacjentka z niepłodnością wtórną (słupki pomarańczowy), pacjentki z niepłodnością pierwotną (słupki czerwone), średnia dla pacjentek płodnych (linia zielona), średnia dla pacjentek po poronieniach nawykowych (linia żółta), średnia dla pacjentek z niepłodnością pierwotną (linia czerwona).

Pomimo dużego zróżnicowania wieku pacjentek nie zaobserwowano związku wartości modułu Younga z wiekiem, natomiast mała liczba pacjentek, szczególnie w wieku powyżej 40 lat uniemożliwiła przeprowadzenie rozszerzonej analizy statystycznej w tym zakresie.

7.3.2. Model komórki

Komórka w proponowanym modelu jest trójwymiarowym, stałym obiektem o kształcie semisfery o promieniu $13,2 \mu\text{m}$, Komórka jest zbudowana z następujących elementów: korteksu stanowiącego zewnętrzną warstwę komórki, cytoplazmy wypełniającej wnętrze komórki oraz znajdującego się w niej jądra (Rys. 37). W modelu nie uwzględniono obecności błony komórkowej gdyż, jak wykazały przeprowadzone symulacje, jej wkład w mierzone właściwości mechaniczne jest niewielki. Również zmiany modułu Younga jądra nie wpływają znacząco na obserwowaną deformację. Komórkę umieszczono na stałym podłożu, analogicznie jak to ma miejsce w pomiarach AFM. Komponenty komórki potraktowano jak liniowe, izotropowe, a więc jednakowe we wszystkich kierunkach materiały elastyczne. Skutkuje to brakiem efektów nieliniowych w modelu, w znaczący sposób ułatwiając obliczenia. Parametry opisujące poszczególne elementy modelowej komórki przedstawiono w tabeli 6. Zmiennymi parametrami w modelowaniu były stosunek grubości korteksu do promienia komórki, oraz moduły Younga korteksu oraz cytoplazmy. W indentacji wykorzystano poruszający się jedynie w kierunku pionowym sferyczny próbnik, którego średnica zmieniała się w zakresie $1\text{-}5 \mu\text{m}$.



Rysunek 37. Geometria komórki w symulacji.

Tabela 6. Charakterystyka elementów modelowej komórki

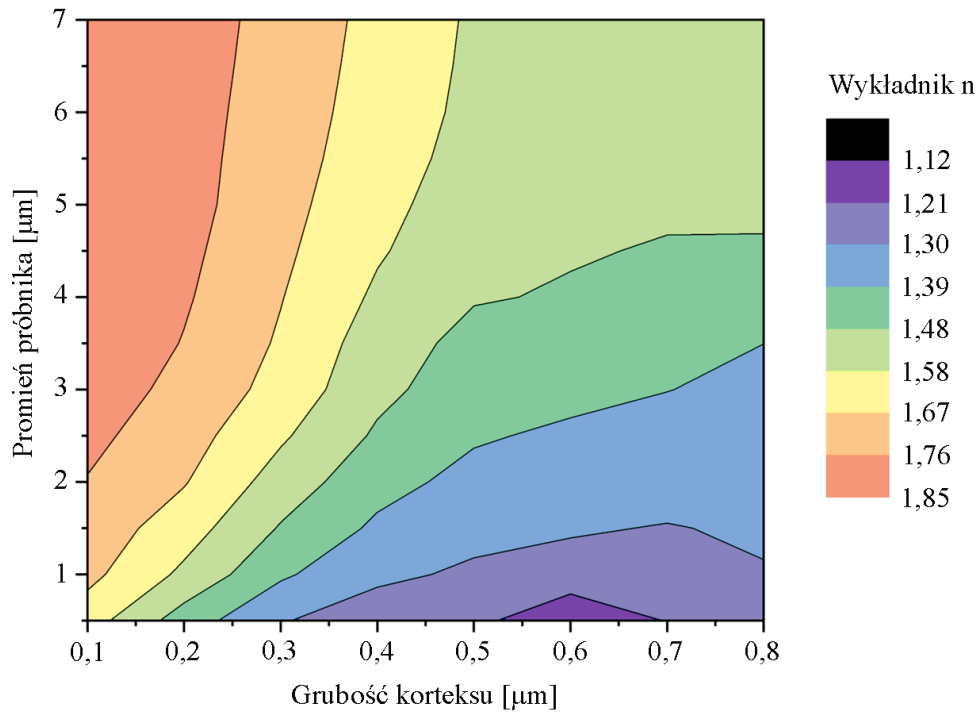
Parametr	Wartość minimalna	Wartość maksymalna
Grubość korteksu t_{korteks}	0,1 μm	0,6 μm
Moduł Younga korteksu E_{korteks}	1 kPa	10 kPa
Moduł Younga cytoplazmy E_{cyto}	0,125 kPa	1 kPa

Podczas modelowania przeprowadzono ok. 750 symulacji, w których wykorzystano liczne kombinacje parametrów, w zakresie możliwych do zaobserwowania w rzeczywistości wartości. Uzyskane wyniki odniesiono do wartości przewidywanych w oparciu o model Hertza. Dopasowane równanie jest funkcją typu Hertza (11), w której zwykle stały i przyjmujący wartość 1,5 wykładnik indentacji n jest parametrem, który może mieć dowolną wartość. Jednocześnie, w celu uproszczenia równania wprowadzono parametr swobodny A .

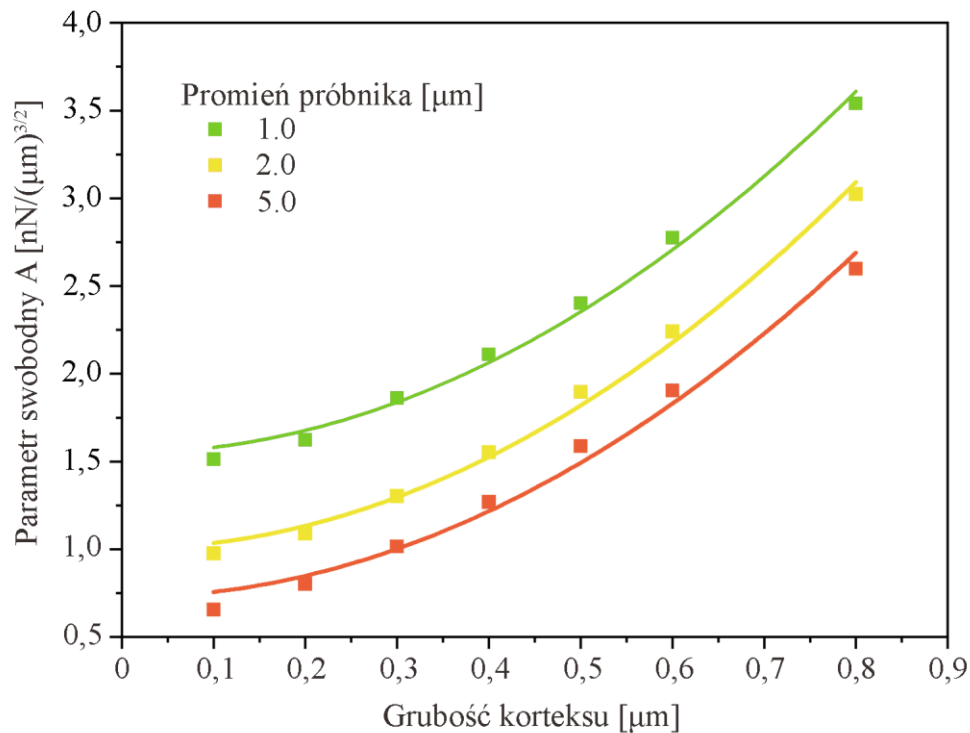
$$F = A\delta^n \quad (11)$$

Poczynione obserwacje pozwoliły na stwierdzenie, że wpływ czynników geometrycznych na głębokość indentacji może być przybliżony jako $\delta^{3/2}$ ($n=1,5$), gdyż wartość ta spełnia równanie w największym zakresie wartości stosunku promienia próbnika do grubości korteksu (Rys. 38). Wykonane eksperymenty pozwoliły na określenie wpływu czynników geometrycznych na uzyskiwane wyniki. W modelowaniu rozważono zarówno zmiany średnicy próbnika (Rys. 39), jak również wpływ grubości korteksu (Rys. 40) i rozmiaru komórki (Rys. 41). Zgodnie z modelem Hertza siła deformacji F podczas indentacji jest zależna od pierwiastka kwadratowego promienia próbnika, jednak funkcja spełniona jest jedynie przy cienkiej warstwie korteksu (Rys. 40). Wyniki uzyskane poprzez przeskalowanie rozmiaru komórki wskazują na niewielki wpływ rozmiaru komórki na jej odpowiedź (Rys. 41). Rysunek 42. prezentuje zależność siły odpowiedzi komórki w zależności od głębokości indentacji w pseudo dwu- i trójwymiarowej komórce wraz z dopasowaniem funkcji Hertza. W modelu pseudo dwuwymiarowym korteks został przedstawiony jako niezwykle cienki obiekt 3D, którego sztywność można pominąć. Wyniki te uzyskano przy parametrach: $t_{\text{korteks}}=0,3 \mu\text{m}$, $R_{\text{próbnik}}=3,5 \mu\text{m}$ oraz $E_{\text{korteks}}=5 \text{ kPa}$ i $E_{\text{cyto}}=0,25 \text{ kPa}$. Różnice pomiędzy modelami 2D

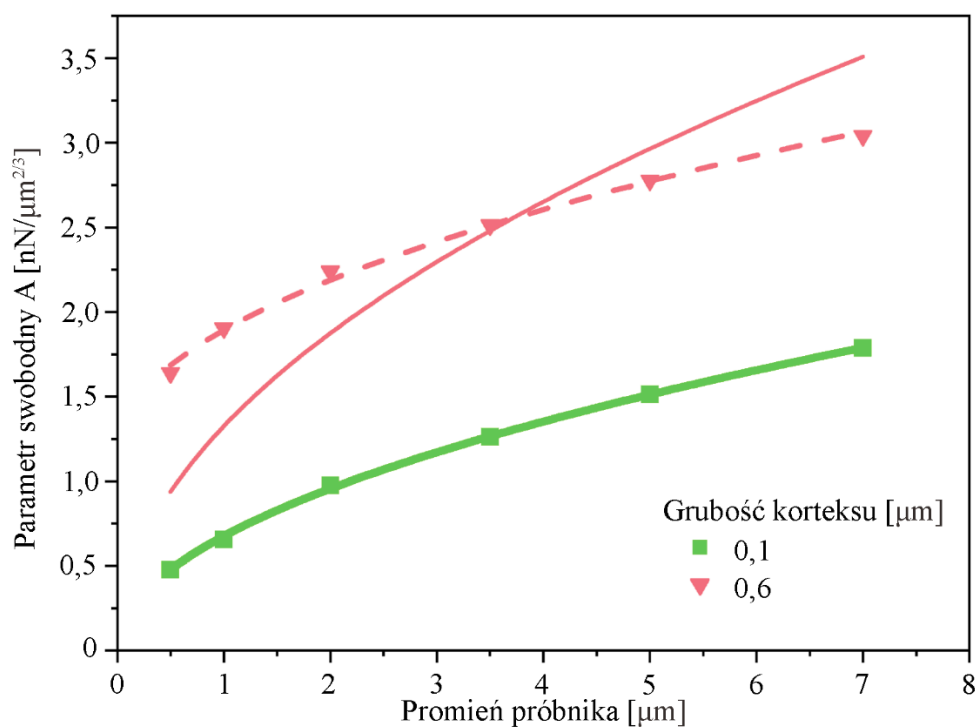
i 3D, szczególnie istotne przy niewielkich głębokościach indentacji oznaczają, że sztywność korteksu nie może zostać pominięta.



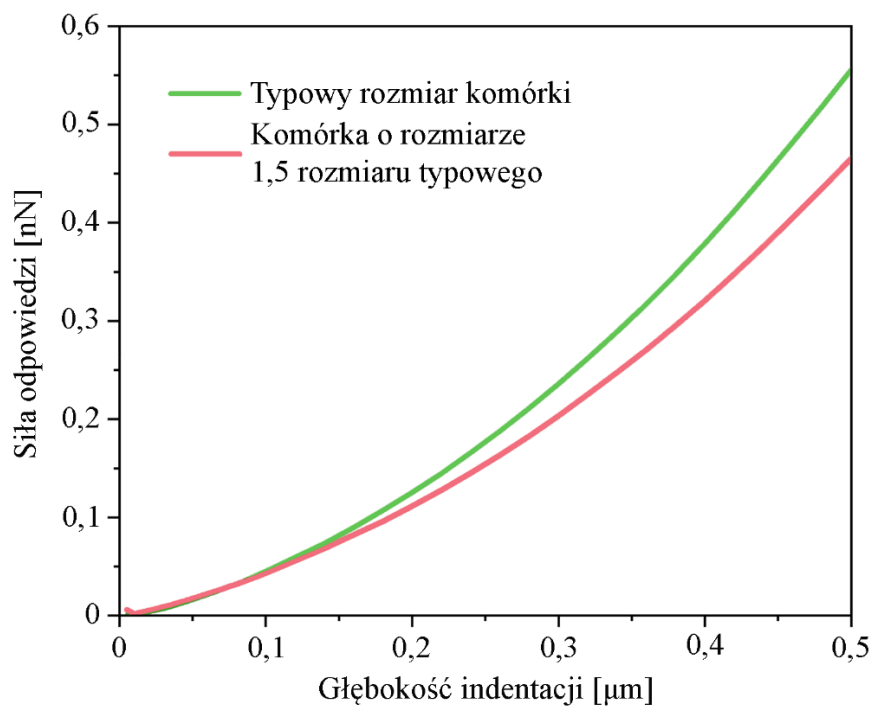
Rysunek 38. Zależność wartości wykładnika n indentacji od grubości korteksu oraz promienia próbника.



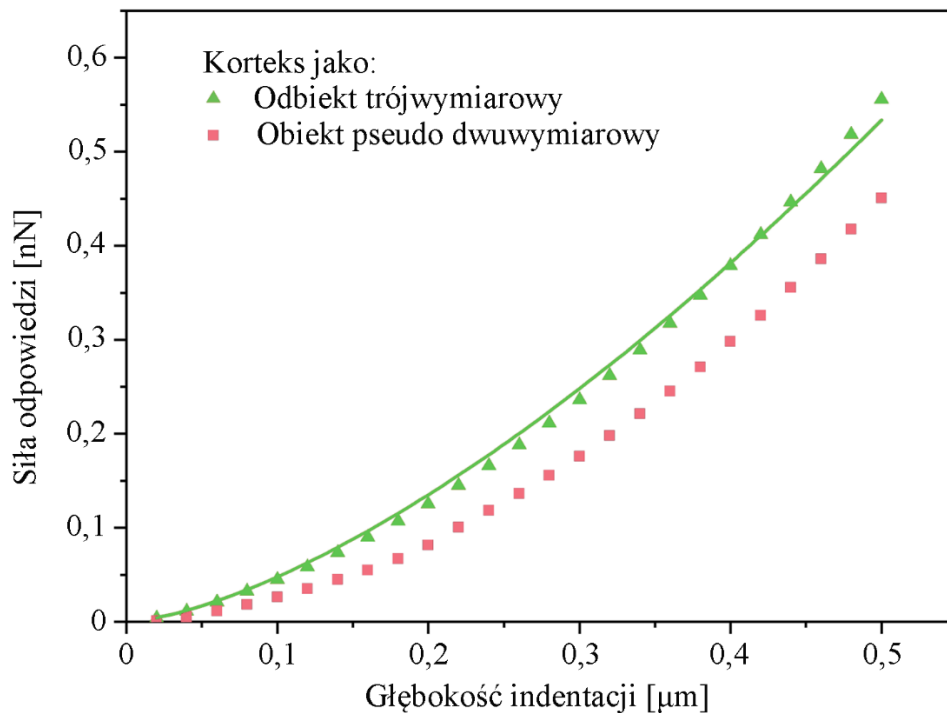
Rysunek 39. Wpływ zmiany rozmiaru próbника na zależność wartości parametru swobodnego A od grubości korteksu.



Rysunek 40. Wpływ zmiany grubości korteksu na zależność wartości parametru swobodnego A od promienia próbника.



Rysunek 41. Wpływ zmiany rozmiaru komórki na zależność wartości siły odpowiedzi od głębokości indentacji.



Rysunek 42. Zależność siły odpowiedzi na głębokość indentacji dla korteksu będącego obiektem pseudo dwuwymiarowym i trójwymiarowym.

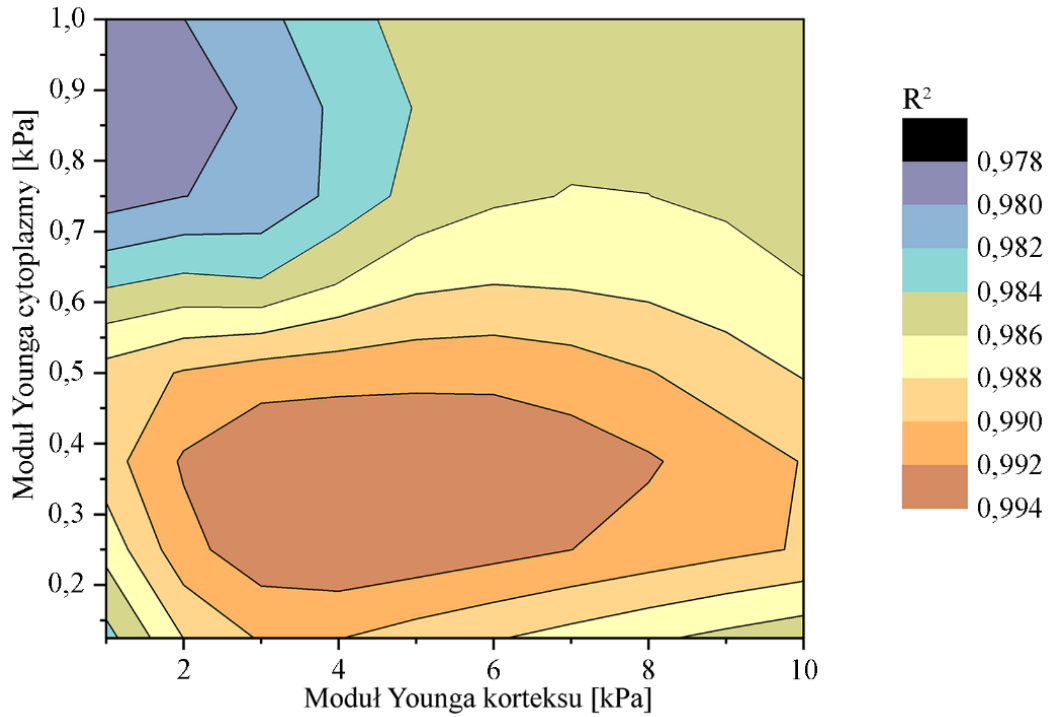
Opracowany model posłużył do analizy parametrów opisujących właściwości mechaniczne komórki w kontekście uzyskiwania wyników zgodnych z modelem typu Hertza. Analiza jakości dopasowania w oparciu o wartość R^2 (Rys. 43) pozwoliła na zaobserwowanie, że odpowiednie wartości modułu Younga mieszczą się w przedziałach 2-8 kPa dla korteksu oraz 0,2-0,5 kPa dla cytoplazmy. Zachowanie komórki scharakteryzowano niezależnymi od geometrii parametrami E^* oraz p , które związane z siłą deformacji równaniem:

$$F = E^*(R^{\frac{1}{2}} + p \cdot t^2)d^{3/2}, \quad (12)$$

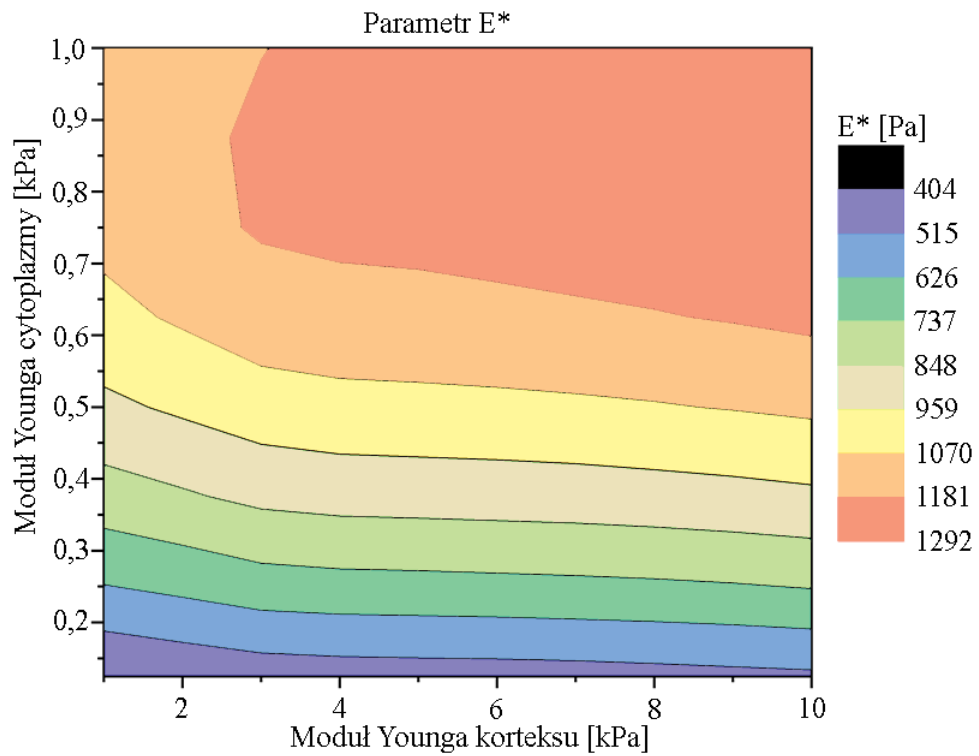
gdzie: t - grubość korteksu,

p , E^* - parametry niezależne. Wartość parametrów E^* i p w odniesieniu do wartości modułu Younga korteksu oraz cytoplazmy przedstawiono na rysunkach, odpowiednio 44 i 45. W oparciu o najlepsze dopasowanie wyznaczono wartości tych parametrów otrzymując równanie dobrze opisujące obserwowane zależności:

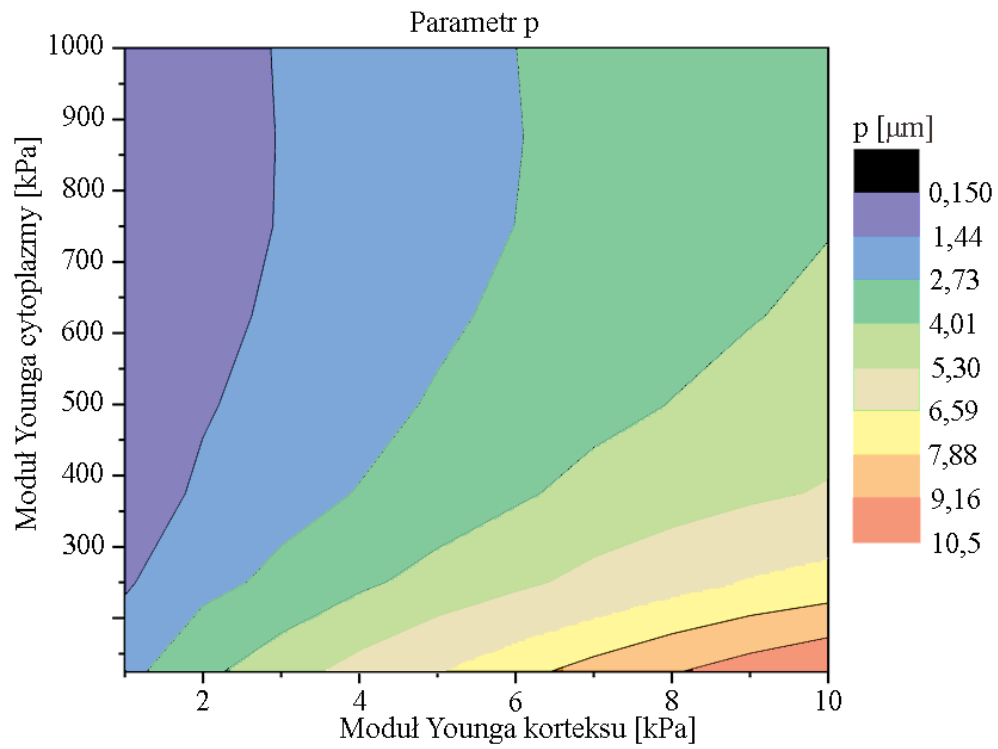
$$F = 0,041 \cdot E_{cyto}^{\frac{1}{2}} \left(R^{\frac{1}{2}} + \frac{3}{2} \left(\frac{E_{korteks}}{E_{cyto}} \right)^{3/2} \cdot t^2 \right) d^{3/2}. \quad (13)$$



Rysunek 43. Wartość współczynnika dopasowania R^2 w zależności od wartości modułu Younga cytoplazmy i korteksu.



Rysunek 44. Wartość parametru E^* w zależności od wartości modułu Younga korteksu oraz cytoplazmy.



Rysunek 45. Wartość parametru p w zależności od wartości modułu Younga korteksu oraz cytoplazmy.

8. Podsumowanie i wnioski

W niniejszej rozprawie doktorskiej opisano eksperymenty z wykorzystaniem mikroskopu sił atomowych pracującego w trybie spektroskopii sił do pomiaru modułu Younga tkanek endometrium, pobieranych od pacjentek ze zdiagnozowanymi zmianami w obrębie macicy. Zastosowanie w pomiarach dwóch typów próbników pozwoliło na wykazanie wpływu kształtu indentera na uzyskiwane wartości modułu Younga. Wyniki otrzymane podczas pomiarów kulką potraktowano jako wartości odniesienia dla wyników uzyskanych przy użyciu ostrza. W ten sposób zaobserwowano związek sztywności tkanki z obecnością polipa lub mikropolipów. Rozwój polipa wpływa na średnio dwukrotny wzrost wartości stosunku modułu Younga wyznaczonego przy pomocy ostrza do wartości uzyskanej przy pomocy kulki, podczas gdy w przypadku mikropolipów zaobserwowano średnio pięciokrotny wzrost tej wielkości. Obecność polipów i mikropolipów w obrębie macicy manifestuje się również poprzez zmianę rozkładu uzyskiwanych wyników. Niniejsze badania wskazują więc na potencjał zastosowania mikroskopii sił atomowych jako techniki uzupełniającej standardową diagnostykę. Pomiar AFM mogą okazać się szczególnie przydatne w przypadku pacjentek dla których obserwacje histopatologiczne nie umożliwiają dokładnego określenia stopnia zaawansowania polipa np. gdy zdiagnozowana zostaje polipowata uformowana błona. Ponadto AFM umożliwi kontrolę regeneracji tkanki, pod względem jej właściwości mechanicznych, po usunięciu zmian polipowatych.

Dodatkowo w oparciu o uzyskane wyniki zaobserwowano, że średnia wartość modułu Younga dla pacjentek z niepłodnością pierwotną jest kilkukrotnie niższa w porównaniu z pacjentkami płodnymi, z niepłodnością wtórną oraz poronieniami nawykowymi. Uzyskany wynik sugeruje, że obniżona wartość stosunku ostrze/kulka może być cechą charakterystyczną dla kobiet u których, często z niewyjaśnionych przyczyn, nie dochodzi do zapłodnienia. Wyższa wartość s ostrze/kulka odnotowano u kobiet, u których doszło w przeszłości do poczęcia, bez względu na to czy pacjentka urodziła dziecko, czy też poroniła. Mikroskopia sił atomowych może więc okazać się narzędziem, które może wspomagać diagnostykę niepłodności, również w przypadku niepłodności o niewyjaśnionej etiologii.

Próbki pobrane w celu przeprowadzenia badania AFM mogą być zróżnicowane w obrębie grupy, gdyż pochodzą z żywego organizmu. Każda tkanka podlega szeregowi

czynników, indywidualnych dla każdej pacjentki, które w różny sposób mogą wpływać na właściwości endometrium. Do czynników tych należą m.in. przebyte choroby, stosowane leki, a także wiek czy też BMI. Postawienie jednoznacznych wniosków dotyczących zależności stosunku ostrz/kulka od płodności oraz zmian patologicznych w obrębie macicy wymaga przeprowadzenia dalszych badań wiążących się z analizą większej liczby próbek. Niewątpliwie jednak prezentowane wyniki potwierdzają hipotezę o istnieniu założonych zależności.

Modelowanie komputerowe stanowi narzędzie pozwalające na uzupełnienie danych uzyskiwanych eksperymentalnie, a jednocześnie opiera się na uzyskanych podczas pomiarów wynikach. Prezentowany model indentacji komórki miał na celu w jak najlepszym stopniu odzwierciedlić zachowanie komórki podczas nacisku próbnikiem. Zaobserwowano, że odpowiedź mechaniczna komórki na indentacji nie zależy od obecności błony komórkowej, jak również od właściwości mechanicznych jądra, natomiast kluczowym elementem komórki jest korteks. Siła indentacji jest związana zależnością kwadratową z grubością korteksu, a także zależy od wielkości próbniaka. Przeprowadzone symulacje z zastosowaniem opracowanego modelu doprowadziły do otrzymania danych spełniających zależności opisane w modelu Hertza. Sparametryzowane równanie pozwala na lepsze scharakteryzowanie właściwości mechanicznych komórki, podczas gdy pierwotne równanie Hertza nie uwzględnia właściwości materiałowym obiektu. Poczyniona modyfikacja nie polegała na zwiększeniu złożoności modelu, a jedynie na uwzględnieniu najważniejszych danych opisujących właściwości mechaniczne. Wyników uzyskanych podczas pomiarów AFM nie można odnieść bezpośrednio do danych z modelowania, gdyż model dotyczy pojedynczej komórki. Jest to jednak pierwszy etap modelowania układu komórek, który mógłby odpowiadać tkance.

9. Literatura

1. Babakhanzadeh, E.; Nazari, M.; Ghasemifar, S.; Khodadadian, A. Some of the factors involved in male infertility: A prospective review. *Int. J. Gen. Med.* **2020**, *13*, 29–41, doi:10.2147/IJGM.S241099.
2. Sharkey, A.M.; Smith, S.K. The endometrium as a cause of implantation failure. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2003**, *17*, 289–307, doi:10.1016/S1521-6934(02)00130-X.
3. Inhorn, M.C.; Patrizio, P. Infertility around the globe: New thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. *Hum. Reprod. Update* **2014**, *21*, 411–426, doi:10.1093/humupd/dmv016.
4. Taylor, E.; Gomel, V. The uterus and fertility. *Fertil. Steril.* **2008**, *89*, 1–16, doi:10.1016/j.fertnstert.2007.09.069.
5. Vander Borgh, M.; Wyns, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. *Clin. Biochem.* **2018**, *62*, 2–10, doi:10.1016/j.clinbiochem.2018.03.012.
6. Cousineau, T.M.; Domar, A.D. Psychological impact of infertility. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2007**, *21*, 293–308, doi:10.1016/j.bpobgyn.2006.12.003.
7. Sheiner, E.K.; Sheiner, E.; Carel, R.; Potashnik, G.; Shoham-Vardi, I. Potential association between male infertility and occupational psychological stress. *J. Occup. Environ. Med.* **2002**, *44*, 1093–1099, doi:10.1097/00043764-200212000-00001.
8. Durairajanayagam, D. Lifestyle causes of male infertility. *Arab J. Urol.* **2018**, *16*, 10–20, doi:10.1016/j.aju.2017.12.004.
9. Logan, S.; Anazodo, A. The psychological importance of fertility preservation counseling and support for cancer patients. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **2019**, *98*, 583–597, doi:10.1111/aogs.13562.
10. Glover, L.; McLellan, A.; Weaver, S.M. What does having a fertility problem mean to couples? *J. Reprod. Infant Psychol.* **2009**, *27*, 401–418, doi:10.1080/02646830903190896.
11. Williams, M.E. Toward greater understanding of the psychological effects of infertility on women. *Psychother. Priv. Pract.* **1997**, *16*, 7–26, doi:10.1300/J294v16n03_02.
12. Kedem, P.; Mikulincer, M.; Nathanson, Y.E.; Bartoov, B. Psychological aspects of male infertility. *Br. J. Med. Psychol.* **1990**, *63*, 73–80, doi:10.1111/j.2044-8341.1990.tb02858.x.

13. National Institute for Health and Care Excellence *Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems*; Roberts, G., Ed.; The Royal College of Obstetricians and Gynaecologists: London, **2017**; ISBN 978-1-4731-0029-9.
14. Smith, S.; Pfeifer, S.M.; Collins, J.A. Diagnosis and Management of Female Infertility. *J. Am. Med. Assoc.* **2003**, *290*, 1767–1770, doi:10.1001/jama.290.13.1767.
15. Breborowicz, G.H. (red. . *Położnictwo Ginekologia, Tom II*; 2nd ed.; Wydawnictwo Lekarskie PZWL: Warszawa, **2015**; ISBN 978-83-200-4999-2.
16. Cohen, S.B.; Bouaziz, J.; Bar On, A.; Orvieto, R. Fertility success rates in patients with secondary infertility and symptomatic cesarean scar niche undergoing hysteroscopic niche resection. *Gynecol. Endocrinol.* **2020**, *36*, 912–916, doi:10.1080/09513590.2020.1716327.
17. Dawson, A.; Fernandez, M.L.; Anglesio, M.; Yong, P.J.; Carey, M.S. Endometriosis and endometriosis-associated cancers: New insights into the molecular mechanisms of ovarian cancer development. *Ecancermedicalscience* **2018**, *12*, 1–16, doi:10.3332/ecancer.2018.803.
18. Nikas, G.; Makrigiannakis, A.; Hovatta, O.; Jones, H.W. Surface morphology of the human endometrium. Basic and clinical aspects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **2000**, *900*, 316–324, doi:10.1111/j.1749-6632.2000.tb06244.x.
19. Munro, S.K.; Farquhar, C.M.; Mitchell, M.D.; Ponnampalam, A.P. Epigenetic regulation of endometrium during the menstrual cycle. *Mol. Hum. Reprod.* **2010**, *16*, 297–310, doi:10.1093/molehr/gaq010.
20. Pan-Castillo, B.; Gazze, S.A.; Thomas, S.; Lucas, C.; Margarit, L.; Gonzalez, D.; Francis, L.W.; Conlan, R.S. Morphophysical dynamics of human endometrial cells during decidualization. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2018**, *14*, 2235–2245, doi:10.1016/j.nano.2018.07.004.
21. Bahar, L.; Kahraman, S.; Eras, N.; Pirkevi, C. Comparison of endometrial biopsies of fertile women and women with repeated implantation failure at the ultrastructural level. *Turkish J. Med. Sci.* **2015**, 706–713, doi:10.3906/sag-1402-153.
22. Guz, N.; Dokukin, M.; Kalaparthy, V.; Sokolov, I. If Cell Mechanics Can Be Described by Elastic Modulus: Study of Different Models and Probes Used in Indentation Experiments. *Biophys. J.* **2014**, *107*, 564–575, doi:10.1016/j.bpj.2014.06.033.

23. Xu, W.; Mezencev, R.; Kim, B.; Wang, L.; McDonald, J.; Sulchek, T. Cell Stiffness Is a Biomarker of the Metastatic Potential of Ovarian Cancer Cells. *PLoS One* **2012**, *7*, doi:10.1371/journal.pone.0046609.
24. Lekka, M.; Gil, D.; Pogoda, K.; Dulińska-Litewka, J.; Jach, R.; Gostek, J.; Klymenko, O.; Prauzner-Bechcicki, S.; Stachura, Z.; Wiltowska-Zuber, J.; et al. Cancer cell detection in tissue sections using AFM. *Arch. Biochem. Biophys.* **2012**, *518*, 151–156, doi:10.1016/j.abb.2011.12.013.
25. Rebelo, L.M.; Sousa, J.S. de; Filho, J.M.; Radmacher, M. Comparison of the viscoelastic properties of cells from different kidney cancer phenotypes measured with atomic force microscopy. *Nanotechnology* **2013**, *24*, 1–12, doi:10.1088/0957-4484/24/5/055102.
26. Ansardamavandi, A.; Tafazzoli-Shadpour, M.; Omidvar, R.; Nili, F. An AFM-based nanomechanical study of ovarian tissues with pathological conditions. *Int. J. Nanomedicine* **2020**, *15*, 4333–4350, doi:10.2147/IJN.S254342.
27. Plodinec, M.; Loparic, M.; Monnier, C.A.; Obermann, E.C.; Zanetti-Dallenbach, R.; Oertle, P.; Hyotyla, J.T.; Aebi, U.; Bentires-Alj, M.; Lim, R.Y.H.; et al. The nanomechanical signature of breast cancer. *Nat. Nanotechnol.* **2012**, *7*, 757–765, doi:10.1038/nano.2012.167.
28. Deptuła, P.; Łysik, D.; Pogoda, K.; Cieśluk, M.; Namiot, A.; Mystkowska, J.; Król, G.; Głuszek, S.; Janmey, P.A.; Bucki, R. Tissue Rheology as a Possible Complementary Procedure to Advance Histological Diagnosis of Colon Cancer. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2020**, *6*, 5620–5631, doi:10.1021/acsbiomaterials.0c00975.
29. Lamontagne, C.; Cuerrier, C.M.; Grandbois, M. AFM as a tool to probe and manipulate cellular processes. *Pflügers Arch. Eur. J. Physiol.* **2008**, *456*, 61–70, doi:10.1007/s00424-007-0414-0.
30. Wray, S. Insights into the uterus. *Exp. Physiol.* **2007**, *92*, 621–631, doi:10.1113/expphysiol.2007.038125.
31. Wu, Z.Y.; Yang, X.M.; Cheng, M.J.; Zhang, R.; Ye, J.; Yi, H.; Ao, J.P.; Zhang, Z.G.; Xu, C.J. Dysregulated cell mechanical properties of endometrial stromal cells from endometriosis patients. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2014**, *7*, 648–655. PMID: 24551285, PMCID: PMC3925909
32. Endometrium. *Hum. protein atlas*. <https://www.proteinatlas.org/humanproteome/tissue/endometrium>, dostęp z dnia 4.06.2021.
33. Garry, R.; Hart, R.; Karthigasu, K.A.; Burke, C. Structural changes in endometrial basal glands during menstruation. *BJOG An Int. J. Obstet. Gynaecol.* **2010**, *117*, 1175–1185, doi:10.1111/j.1471-0528.2010.02630.x.

34. Smith, S.K. Regulation of angiogenesis in the human endometrium. *Trends Endocrinol. Metab.* **2001**, *12*, 147–151, doi:10.1016/S1043-2760(01)00379-4.
35. Yamaguchi, M.; Yoshihara, K.; Suda, K.; Nakaoka, H.; Yachida, N.; Ueda, H.; Sugino, K.; Mori, Y.; Yamawaki, K.; Tamura, R.; et al. Three-dimensional understanding of the morphological complexity of the human uterine endometrium. *iScience* **2021**, *24*, 102258, doi:10.1016/j.isci.2021.102258.
36. Ovulation. *Encycl. Br.* 2013. <https://www.britannica.com/science/ovulation>, dostęp z dnia 5.06.2021.
37. Sakai, S.; Hagihara, N.; Kuse, M.; Kimura, K.; Okuda, K. Heat stress affects prostaglandin synthesis in bovine endometrial cells. *J. Reprod. Dev.* **2018**, *64*, 311–317, doi:10.1262/jrd.2018-051.
38. Xiao, L.; Zhang, Q.; Huang, X.; He, A.; Xie, S.; Li, Y. Endometrial stromal cell miR-29c-3p regulates uterine contraction. *Reproduction* **2019**, *158*, 493–501, doi: 10.1530/REP -19-0196.
39. Salamonsen, L.A.; Nie, G.; Hannan, N.J.; Dimitriadis, E. Society for reproductive biology founders lecture 2009. Preparing fertile soil: The importance of endometrial receptivity. *Reprod. Fertil. Dev.* **2009**, *21*, 923–934, doi:10.1071/RD09145.
40. Gellersen, B.; Reimann, K.; Samalecos, A.; Aupers, S.; Bamberger, A.M. Invasiveness of human endometrial stromal cells is promoted by decidualization and by trophoblast-derived signals. *Hum. Reprod.* **2010**, *25*, 862–873, doi:10.1093/humrep/dep468.
41. Critchley, H.O.D.; Maybin, J.A.; Armstrong, G.M.; Williams, A.R.W. Physiology of the endometrium and regulation of menstruation. *Physiol. Rev.* **2020**, *100*, 1149–1179, doi:10.1152/physrev.00031.2019.
42. Yamagata, Y.; Asada, H.; Tamura, I.; Lee, L.; Maekawa, R.; Taniguchi, K.; Taketani, T.; Matsuoka, A.; Tamura, H.; Sugino, N. DNA methyltransferase expression in the human endometrium: Down-regulation by progesterone and estrogen. *Hum. Reprod.* **2009**, *24*, 1126–1132, doi:10.1093/humrep/dep015.
43. Zajkowska, M.; Lubowicka, E.; Szmitkowski, M.; Ławicki, S. Czynniki z rodziny VEGF oraz ich receptory w diagnostyce raka piersi [VEGF family factors and their receptors in the diagnostics of breast cancer]. *Diagn Lab.* **2018**, *54*, 2, s. 105–112.
44. Barańska, P.; Jerczyńska, H.; Pawłowska, Z. Czynniki wzrostu śródbłonna naczyń – budowa i funkcje. *Postepy Biochem.* **2005**, *5*, 12–21.
45. Epigenetics. <https://www.novusbio.com/research-areas/epigenetics> , dostęp z dnia 5.06.2021.

46. Nayan, V.; Onteru, S.K.; Singh, D. Reproduction and nutriment–nurture crosstalk: epigenetic perspectives. *J. Reprod. Heal. Med.* **2015**, *1*, 50–59, doi:10.1016/j.jrh.2015.07.002.
47. Ciechomska, M.; Roszkowski, L.; Maslinski, W. DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis. *Cells* **2019**, *8*, 1–16, doi:10.3390/cells8090953.
48. Large, M.J.; Wetendorf, M.; Lanz, R.B.; Hartig, S.M.; Creighton, C.J.; Mancini, M.A.; Kovanci, E.; Lee, K.; Threadgill, D.W.; Lydon, J.P.; et al. The Epidermal Growth Factor Receptor Critically Regulates Endometrial Function during Early Pregnancy. *PLoS Genet.* **2014**, *10*, 1–18, doi:10.1371/journal.pgen.1004451.
49. Małgorzata, S.; Przemysław, W.; Jana, S. Ekspresja genu HOXA11 w endometrium kobiet bez i z zaburzeniami płodności [HOXA11 gene expression in women with and without impaired infertility.] *Ginekol Pol.* **2010**, 414–421. PMID: 20695189.
50. Jin, X.Y.; Zhao, L.J.; Luo, D.H.; Liu, L.; Dai, Y.D.; Hu, X.X.; Wang, Y.Y.; Lin, X.; Hong, F.; Li, T.C.; et al. Pinopode score around the time of implantation is predictive of successful implantation following frozen embryo transfer in hormone replacement cycles. *Hum. Reprod.* **2017**, *32*, 2394–2403, doi:10.1093/humrep/dex312.
51. Kim, S.-M.; Kim, J.-S. A Review of Mechanisms of Implantation. *Dev. Reprod.* **2017**, *21*, 351–359, doi:10.12717/dr.2017.21.4.351.
52. Zhu, H.; Hou, C.C.; Luo, L.F.; Hu, Y.J.; Yang, W.X. Endometrial stromal cells and decidualized stromal cells: Origins, transformation and functions. *Gene* **2014**, *551*, 1–14, doi:10.1016/j.gene.2014.08.047.
53. Thie, M.; Benoit, M.; Ludwig, M.; Gaub, H.E.; Denker, H. Interactions between trophoblast and uterine epithelium : monitoring of adhesive forces. *Hum. Reprod.* **1998**, *13*, 3211–3219, doi:10.1093/humrep/13.11.3211.
54. Thie, M.; Denker, H.W. In vitro studies on endometrial adhesiveness for trophoblast: Cellular dynamics in uterine epithelial cells. *Cells Tissues Organs* **2002**, *172*, 237–252, doi:10.1159/000066963.
55. Coukos, G.; Ph, D. Integrins, Endometrial Maturation, & Human Embryo Implantation. *Semin. Reprod. Endocrinol.* **1998**, *16*, 219–229, doi:10.1055/s-2007-1016280.
56. Klentzeris, L.D.; Bulmer, J.N.; Trejdosiewicz, L.K.; Morrison, L.; Cooke, I.D. Infertility: Beta-1 integrin cell adhesion molecules in the endometrium of fertile and infertile women. *Hum. Reprod.* **1993**, *8*, 1223–1230, doi:10.1093/oxfordjournals.humrep.a138231.

57. Ochoa-Bernal, M.A.; Fazleabas, A.T. Physiologic events of embryo implantation and decidualization in human and non-human primates. *Int. J. Mol. Sci.* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21061973.
58. Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G.D.; de Mouzon, J.; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K.; Sullivan, E.; Vanderpoel, S. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009*. *Fertil. Steril.* **2009**, *92*, 1520–1524, doi:10.1016/j.fertnstert.2009.09.009.
59. Zegers-Hochschild, F.; Adamson, G.D.; Dyer, S.; Racowsky, C.; de Mouzon, J.; Sokol, R.; Rienzi, L.; Sunde, A.; Schmidt, L.; Cooke, I.D.; et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertil. Steril.* **2017**, *108*, 393–406, doi:10.1016/j.fertnstert.2017.06.005.
60. Tamrakar, S.R.; Bastakoti, R. Determinants of Infertility in Couples. *J. Nepal Health Res. Counc.* **2019**, *17*, 85–89, doi:10.33314/jnhrc.1827.
61. Agarwal, A.; Mulgund, A.; Hamada, A.; Chyatte, M.R. A unique view on male infertility around the globe. *Reprod. Biol. Endocrinol.* **2015**, *13*, 1–9, doi:10.1186/s12958-015-0032-1.
62. Salim, S.; Naser, A.; Alhabbash, M.I. Male Infertility Expert System Diagnoses and Treatment. *Am. J. innov. res. appl. sci.* **2016**, 181–192.
63. Blasco, V.; Pinto, F.M.; Fernández-Atucha, A.; González-Ravina, C.; Fernández-Sánchez, M.; Candenas, L. Female infertility is associated with an altered expression of the neurokinin B/neurokinin B receptor and kisspeptin/kisspeptin receptor systems in ovarian granulosa and cumulus cells. *Fertil. Steril.* **2020**, *114*, 869–878, doi:10.1016/j.fertnstert.2020.05.006.
64. Davis, M.F.; Khosla, R. Infertility and Human Rights: A Jurisprudential Survey. *Columbia J. Gend. Law* **2020**, *40*, 1–45. doi: 10.7916/cjgl.v40i1.6847.
65. Florek, E.; Szymanowski, K. Rola wybranych składników pożywienia w profilaktyce niepłodności u kobiet. *Bromatol. i Chem. Toksykol.* **2010**, 138–144.
66. Lin, H.; Li, Y.; Ou, S.; Jiao, X.; Wang, W.; Humaidan, P.; Zhang, Q. Role of the total progressive motile sperm count (TPMSC) in different infertility factors in IUI: A retrospective cohort study. *BMJ Open* **2021**, *11*, 1–8, doi:10.1136/bmjopen-2020-040563.
67. Witchel, S.F.; Burghard, A.C.; Tao, R.H.; Oberfield, S.E. The diagnosis and treatment of PCOS in adolescents: An update. *Curr. Opin. Pediatr.* **2019**, *31*, 562–569, doi:10.1097/MOP.0000000000000778.
68. Kallen, A.N.; Kodaman, P.H. Rozpoznanie i leczenie niepłodności spowodowanej czynnikiem jajowodowym. *Infertility* **2011**, 19–27.

69. Guan, J.; Watrelot, A. Fallopian tube subtle pathology. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2019**, *59*, 25–40, doi:10.1016/j.bpobgyn.2018.12.012.
70. Turoń, K. Niepłodność w aspekcie opieki położniczej. *Pol. Przegląd Nauk o Zdrowiu* **2017**, *4*, 531. doi: 10.20883/ppnoz.2017.73.
71. Lee, W.L.; Liu, C.H.; Cheng, M.; Chang, W.H.; Liu, W.M.; Wang, P.H. Focus on the primary prevention of intrauterine adhesions: Current concept and vision. *Int. J. Mol. Sci.* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22105175.
72. Awonuga, A.O.; Fletcher, N.M.; Saed, G.M.; Diamond, M.P. Postoperative adhesion development following cesarean and open intra-abdominal gynecological operations: A review. *Reprod. Sci.* **2011**, *18*, 1166–1185, doi:10.1177/1933719111414206.
73. Liedler, M.; Woisetschläger, G. Influence of postoperative adhesions after caesarean section on chronic lower back pain – A pilot study of osteopathic manipulative treatment. *Eur. J. Osteopath. Res.* **2019**, *1*, 38–46, doi:10.35740/ejor.2019.1.1.5.
74. Pomorski, M.; Fuchs, T.; Rosner-Tenerowicz, A.; Zimmer, M. Nisza w bliźnie macicy po cięciu cesarskim — etiologia , diagnostyka ultrasonograficzna i następstwa kliniczne niecałkowitego zagojenia się rany macicy po cięciu cesarskim clinical implications of incomplete healing of the uterine cesarean section scar. *Ginekol. i Perinatol. Prakt.* **2017**, *2*, 93–100.
75. Klimek, H.; Wawrzyniak, K.; Dzieńiecka, M.; Sieroszewski, P. Nieprawidłowa implantacja łożyska — diagnostyka , postępowanie , doświadczenia własne [Pathology of placenta — diagnostics , treatment , personal experience]. *Ginekol. i Perinatol. Prakt.* **2017**, 48–52.
76. Yanaihara, A.; Yorimitsu, T.; Motoyama, H.; Iwasaki, S.; Kawamura, T. Location of endometrial polyp and pregnancy rate in infertility patients. *Fertil. Steril.* **2008**, *90*, 180–182, doi:10.1016/j.fertnstert.2007.05.072.
77. Maher, P. Fibroids and Infertility. *Gynecol. Endosc. Infertil.* **2005**, 527–527, doi:10.5005/jp/books/10334_61.
78. Zhu, P.D.J.; Arsovska, Bs.B.; Kozovska, Bs.K. Acupuncture Treatment in Patient with Uterine Polyp. *Int. J. Innov. Res. Med. Sci.* **2018**, *3*, 12–14, doi:10.23958/ijirms/vol03-i12/508.
79. McGurgan, P.; Taylor, L.J.; Duffy, S.R.; O'Donovan, P.J. Are endometrial polyps from pre-menopausal women similar to post-menopausal women? An immunohistochemical comparison of endometrial polyps from pre- and post-menopausal women. *Maturitas* **2006**, *54*, 277–284, doi:10.1016/j.maturitas.2005.12.003.

80. Kitaya, K.; Tada, Y.; Taguchi, S.; Funabiki, M.; Hayashi, T.; Nakamura, Y. Local mononuclear cell infiltrates in infertile patients with endometrial macropolyps versus micropolyps. *Hum. Reprod.* **2012**, *27*, 3474–3480, doi:10.1093/humrep/des323.
81. Wethington, S.L.; Herzog, T.J.; Burke, W.M.; Sun, X.; Lerner, J.P.; Lewin, S.N.; Wright, J.D. Risk and predictors of malignancy in women with endometrial polyps. *Ann. Surg. Oncol.* **2011**, *18*, 3819–3823, doi:10.1245/s10434-011-1815-z.
82. Skrzypczak, J.; Jasiński, P.; Wirstlein, P.; Goździewicz, T.; Rajewski, M. Histologiczne zmiany w łożyskach i kosmówkach u kobiet z zespołem antyfosfolipidowym i trombofilią wrodzoną. *Ginekol. Pol.* **2011**, *82*, 652–663.
83. Zondervan, K.T.; Becker, C.M.; Koga, K.; Missmer, S.A.; Taylor, R.N.; Vigan, P. Endometriosis. *Nat. Rev. Dis. Prim.* **2018**, *4*, doi:10.1038/s41572-018-0008-5.
84. Ferenczy, A. Pathophysiology of adenomyosis. *Hum. Reprod.* **1998**, *4*, 312–322. doi: 10.1093/humupd/4.4.312.
85. Kvaskoff, M.; Mu, F.; Terry, K.L.; Harris, H.R.; Poole, E.M.; Farland, L.; Missmer, S.A. Endometriosis: A high-risk population for major chronic diseases? *Hum. Reprod. Update* **2014**, *21*, 500–516, doi:10.1093/humupd/dmv013.
86. Morice, P.; Leary, A.; Creutzberg, C.; Abu-rustum, N.; Darai, E.; Vi, P. Endometrial cancer. *Lancet* **2016**, *387*, 1094–1108, doi:10.1016/S0140-6736(15)00130-0.
87. Lv, S.; Wang, R.; Wang, Q.; Han, L.; Tuo, X.; Hou, H.; Liu, Y.; Shi, Z.; Wang, Q.; Li, Y.; et al. A novel solution configuration on liquid-based endometrial cytology. *PLoS One* **2018**, *13*, 1–13, doi:10.5061/dryad.f5s54.Funding.
88. Mcalpine, J.N.; Temkin, S.M.; Mackay, H.J. Endometrial Cancer : Not Your Grandmother ' s Cancer. *Cancer* **2016**, *122*, 2787–2798, doi:10.1002/cncr.30094.
89. Sznurkowski, J.J.; Knapp, P.; Bodnar, L.; Bidziński, M.; Jach, R.; Misiek, M.; Bieńkiewicz, A.; Blecharz, P.; Kojs, Z.; Kotarski, J.; et al. Zalecenia Polskiego Towarzystwa Ginekologii Onkologicznej dotyczące diagnostyki i leczenia raka endometrium. *Curr. Gynecol. Oncol.* **2017**, *15*, 34–44, doi:10.15557/CGO.2017.0003.
90. Bellone, S.; Eliana, B.; Lonardi, S.; Ferrari, F.; Centritto, F.; Masserdotti, A.; Pettinella, F.; Black, J.; Menderes, G.; Hui, P.; et al. Polymerase ε (POLE) ultra-mutation in uterine tumors correlates with T lymphocyte infiltration and increased resistance to platinum-based chemotherapy in vitro. *Gynecol Oncol.* **2017**, *144*, 146–152, doi:10.1016/j.ygyno.2016.11.023.Polymerase.

91. Krejczy, K.; Cymbaluk-Płoska, A.; Kwiatkowski, S.; Chudecka-Głaz, A. Molecular characteristics of endometrial cancer and their potential effect on clinical management. *Curr. Gynecol. Oncol.* **2018**, *16*, 245–250, doi:10.15557/CGO.2018.0028.
92. Żyła, M.M.; Kostrzewa, M.; Litwińska, E.; Szpakowski, A.; Wilczyński, J.R.; Stetkiewicz, T. The role of angiogenic factors in endometrial cancer. *Prz. Menopauzalny* **2014**, *18*, 122–126, doi:10.5114/pm.2014.42714.
93. Olesen, F.; Rose, P.; Nafees, S.; Rijswijk, E. Van; Hiom, S.; Muth, C.; Beyer, M.; Neal, R.D. The Aarhus statement : improving design and reporting of studies on early cancer diagnosis Clinical Studies. *Br. J. Cancer* **2012**, *106*, 1262–1267, doi:10.1038/bjc.2012.68.
94. Costas, L.; Frias-Gomez, J.; Guardiola, M.; Benavente, Y.; All, E. New perspectives on screening and early detection of endometrial cancer. *Int. J. Cancer* **2019**, *00*, 1–13, doi:10.1002/ijc.32514.
95. Heitzer, E.; Roberts, C.E.S.; Speicher, M.R. Current and future perspectives of liquid biopsies in genomics-driven oncology. *Nat. Rev. Genet.* **2019**, *20*, doi:10.1038/s41576-018-0071-5.
96. Pucci, C.; Martinelli, C.; Ciofani, G. Innovative approaches for cancer treatment : current perspectives and new challenges. *Ecancermedicalscience* **2019**, *13*, 1–26, doi: 10.3332/ecancer.2019.961.
97. Ylöstalo, P.R. Ultrasonography of endometrium. *Ann. Med.* **1990**, *22*, 105–108, doi:10.3109/07853899009147251.
98. Bosch, T. Van Den Ultrasound in the diagnosis of endometrial and intracavitary pathology : an update. *Australas. J. ultrasound Med.* **2012**, *15*, 1–5. doi: 10.1002/j.2205-0140.2012.tb00135.x.
99. Baral, R.; Pudasaini, S. Histopathological pattern of endometrial samples in abnormal uterine bleeding. *J. Pathol. Nepal* **2011**, *1*, 13–16, doi:10.3126/jpn.v1i1.4443.
100. de Franciscis, P.; Riemma, G.; Schiattarella, A.; Cobellis, L.; Guadagno, M.; Vitale, S.G.; Mosca, L.; Cianci, A.; Colacurci, N. Concordance between the hysteroscopic diagnosis of endometrial hyperplasia and histopathological examination. *Diagnostics* **2019**, *9*, 1–9, doi:10.3390/diagnostics9040142.
101. Swami, M.B.; Sharma, P. Histopathological evaluation of endometrium in pre and postmenopausal uterine bleeding. *Indian J. Obstet. Gynecol. Res.* **2015**, *2*, 264, doi:10.5958/2394-2754.2015.00028.4.

102. Litta, P.; Merlin, F.; Saccardi, C.; Pozzan, C.; Sacco, G.; Fracas, M.; Capobianco, G.; Dessole, S. Role of hysteroscopy with endometrial biopsy to rule out endometrial cancer in postmenopausal women with abnormal uterine bleeding. *Maturitas* **2005**, *50*, 117–123, doi:10.1016/j.maturitas.2004.05.003.
103. Horn, L.C.; Meinel, A.; Handzel, R.; Eienkel, J. Histopathology of endometrial hyperplasia and endometrial carcinoma. An update. *Ann. Diagn. Pathol.* **2007**, *11*, 297–311, doi:10.1016/j.anndiagpath.2007.05.002.
104. La Sala, G.B.; Montanari, R.; Dessanti, L.; Cigarini, C.; Sartori, F. The role of diagnostic hysteroscopy and endometrial biopsy in assisted reproductive technologies. *Fertil. Steril.* **1998**, *70*, 378–380, doi:10.1016/S0015-0282(98)00147-2.
105. Gupta, P.; Gupta, N.; Dey, P. Morphometric analysis of endometrial cells in liquid-based cervical cytology samples. *Cytopathology* **2017**, *28*, 140–148, doi:10.1111/cyt.12364.
106. Kirk, D.; King, R.J.B.; Heyes, J.; Peachey, L.; Hirsch, P.J.; Taylor, R.W.T. Normal human endometrium in cell culture - I. Separation and characterization of epithelial and stromal components in vitro. *In Vitro* **1978**, *14*, 651–662, doi:10.1007/BF02616162.
107. Quinn, C.; Ryan, E.; Claessens, E.A.; Greenblatt, E.; Hawrylyshyn, P.; Cruickshank, B.; Hannam, T.; Dunk, C.; Casper, R.F. The presence of pinopodes in the human endometrium does not delineate the implantation window. *Fertil. Steril.* **2007**, *87*, 1015–1021, doi:10.1016/j.fertnstert.2006.08.101.
108. Francis, L.W.; Lewis, P.D.; Gonzalez, D.; Ryder, T.A.; Webb, G.; Joels, L.A.; White, J.O.; Wright, C.J.; Conlan, R.S. Progesterone induces nano-scale molecular modifications on endometrial epithelial cell surfaces. *Biol. cell* **2009**, *101*, 481–493, doi:10.1042/BC20080189.
109. Gonzalez, D.; Thackeray, H.; Lewis, P.D.; Mantani, A.; Brook, N.; Ahuja, K.; Margara, R.; Joels, L.; White, J.O.; Conlan, R.S. Loss of WT1 Expression in the Endometrium of Infertile PCOS Patients: A Hyperandrogenic Effect? *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2012**, *97*, 957–966, doi:10.1210/jc.2011-2366.
110. Harada, M.; Osuga, Y.; Hirota, Y.; Koga, K.; Morimoto, C.; Hirata, T. Mechanical Stretch Stimulates Interleukin-8 Production in Endometrial Stromal Cells: Possible Implications in Endometrium-Related Events. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90*, 1144–1148, doi:10.1210/jc.2004-1089.

111. Trapero, C.; Vidal, A.; Fernández-Montolí, M.E.; Coroleu, B.; Tresserra, F.; Barri, P.; De Aranda, I.G.; Sévigny, J.; Ponce, J.; Matias-Guiu, X.; et al. Impaired expression of ectonucleotidases in ectopic and eutopic endometrial tissue is in favor of ATP accumulation in the tissue microenvironment in endometriosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20225532.
112. Aliagas, E.; Vidal, A.; Texidó, L.; Ponce, J.; Condom, E.; Martín-Satué, M. High expression of ecto-nucleotidases CD39 and CD73 in human endometrial tumors. *Mediators Inflamm.* **2014**, 2014:509027, doi:10.1155/2014/509027.
113. Gargett, C.E.; Schwab, K.E.; Zillwood, R.M.; Nguyen, H.P.T.; Wu, D. Isolation and Culture of Epithelial Progenitors and Mesenchymal Stem Cells from Human Endometrium. *Biol. Reprod.* **2009**, *80*, 1136–1145, doi:10.1095/biolreprod.108.075226.
114. Parlatan, U.; Inanc, M.T.; Ozgor, B.Y.; Oral, E.; Ercan, B. Raman spectroscopy as a non- invasive diagnostic technique for endometriosis. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–7, doi:10.1038/s41598-019-56308-y.
115. Notarstefano, V.; Gioacchini, G.; Byrne, H.J.; Zacà, C.; Sereni, E.; Vaccari, L.; Borini, A.; Carnevali, O.; Giorgini, E. Vibrational characterization of granulosa cells from patients affected by unilateral ovarian endometriosis : New insights from infrared and Raman microspectroscopy. *Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **2019**, *212*, 206–214, doi:10.1016/j.saa.2018.12.054.
116. Lewicki, A.; Jakubowski, W. Wstęp do ultrasonografii - dlaczego to działa? *Przegląd Urol.* **2014**, *4*.
117. Ilavarasi, C.; Jyothi, G.; Alva, N. Study of the efficacy of pipelle biopsy technique to diagnose endometrial diseases in abnormal uterine bleeding. *J. Midlife. Health* **2019**, *10*, 75–80, doi:10.4103/jmh.JMH_109_18.
118. Symonds, I. Ultrasound, hysteroscopy and endometrial biopsy in the investigation of endometrial cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **2001**, *15*, 381–391, doi:10.1053/beog.2000.0183.
119. Møller, L.M.A.; Berget, A. Prehysterectomy curettage in women with uterine fibromyomata is not worthwhile. *Acta Obstet. Gynecol. Scand.* **1993**, *72*, 374–376, doi:10.3109/00016349309021116.
120. Lensen, S.; Martins, W.; Nastri, C.; Sadler, L.; Farquhar, C. Pipelle for Pregnancy (PIP): Study protocols for three randomised controlled trials. *Trials* **2016**, *17*, 7, doi:10.1186/s13063-016-1301-9.
121. Korczyński, J.; Gacek, G. Mikroskopia świetlna. *Przegląd Hod.* **2015**, 37–41.
122. Schneider, C.A.; Rasband, W.S.; Eliceiri, K.W. NIH Image to ImageJ : 25 years of image analysis. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 671–675, doi:10.1038/nmeth.2089.

123. Inkson, B.J. Scanning Electron Microscopy (SEM) and Transmission Electron Microscopy (TEM) for Materials Characterization; *Elsevier Ltd*, **2016**; ISBN 9780081000571.
124. Szala, S.; Wiśniewska, E.; Matuszczak, S.; Czapla, J. Mezenchymalne komórki zrębu. *Postepy Hig. Med. Dosw.* **2014**, 68, 1287–1298.
125. Lichtman, J.W.; Conchello, J.A. Fluorescence microscopy. *Nat. Methods* **2005**, 2, 910–919, doi:10.1038/nmeth817.
126. Thorn, K. A quick guide to light microscopy in cell biology. *Mol. Biol. Cell* **2016**, 27, 219–222, doi:10.1091/mbc.E15-02-0088.
127. Cox, G. Biological confocal microscopy. *Mater. Today* **2002**, 5, 34–41, doi:10.1016/S1369-7021(02)05329-4.
128. Jeong, D.; Lee, Y.; Lee, S. V Western Blot Analysis of *C. elegans* Proteins. *Methods Mol Biol.* **2018**, 1742, 213–225. doi: 10.1007/978-1-4939-7665-2_19.
129. Pierzynski, P.; Zbucka-Kretowska, M. Czynność skurczowa macicy przed transferem zarodków jako nowy punkt docelowy farmakoterapii w leczeniu niepłodności. *Ginekol. Pol.* **2014**, 85, 609–613, doi:10.17772/gp/1780.
130. Kotarski, J.; Kwaśniewska, A.; Oleszczuk, J. Rekomendacje Zespołu Ekspertów Polskiego Towarzystwa Ginekologicznego dotyczące opieki okołoporodowej i prowadzenia. *Ginekol. Pol.* **2011**, 128–136.
131. Jarczak, J.; Ślaska, B. Łańcuchowa Reakcja Polimerazy. *Przegląd Hod.* **2011**, 4–8.
132. Ehtisham, M.; Wani, F.; Wani, I.; Kaur, P.; Nissar, S. Polymerase Chain Reaction (PCR): Back to Basics. *Indian J. Contemp. Dent.* **2016**, 4, 30, doi:10.5958/2320-5962.2016.00030.9.
133. Aryal, S. Polymerase Chain Reaction (PCR)- Principle, Procedure, Types, Applications and Animation. *Microbiol. info* **2018**.
134. Kuang, J.; Yan, X.; Genders, A.J.; Granata, C.; Bishop, D.J. An overview of technical considerations when using quantitative real-time PCR analysis of gene expression in human exercise research. *PLoS One* **2018**, 13, 1–27, doi:10.1371/journal.pone.0196438.
135. Premjeet, S.; Deepika, G.; Sudeep, B.; Sonam, J.; Sahil, K.; Devashish, R.; Sunil, K. Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay (ELISA), basics and its application: A comprehensive review. *J. Pharm. Res.* **2011**, 4, 4581–4583.
136. Shah, K.; Maghsoudlou, P. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): The basics. *Br. J. Hosp. Med.* **2016**, 77, C98–C101, doi:10.12968/hmed.2016.77.7.C98.

137. Olszewski, W. Podstawy patologii nowotworów. in: Podstawy onkologii klinicznej; *Centrum Medyczne Kształcenia Podyplomowego*, **2011**; pp. 29–40 ISBN 978-83-62110-24-7.
138. Bres, E. Kariera barwników w histologii. *Wszechświat* **2012**, 113, 260–267.
139. Skotny, A.; Pucińska, J. Współczesna cytometria przepływowa. *Acta Bio-Optica Inform. Medica* **2013**, 19, 3–11.
140. Gasharova, B. Raman, Conventional Infrared and Synchrotron Infrared Spectroscopy in Mineralogy and Geochemistry: Basics and Applications. *Instrum. Tech. Appl. to Mineral. Geochemistry* **2008**, 5, 57–81.
141. Geraldès, C.F.G.C. Introduction to infrared and raman-based biomedical molecular imaging and comparison with other modalities. *Molecules* **2020**, 25, 3, doi:10.3390/molecules2523547.
142. Rutherford, E.J.; Hill, A.D.K.; Hopkins, A.M. Adhesion in Physiological , Benign and Malignant Proliferative States of the Endometrium : Microenvironment and the Clinical Big Picture. *Cells* **2018**, 7, 1–18, doi:10.3390/cells7050043.
143. Chivukula, V.K.; Krog, B.L.; Nauseef, J.T.; Henry, M.D.; Vigmostad, S.C. Alterations in cancer cell mechanical properties after fluid shear stress exposure: A micropipette aspiration study. *Cell Health Cytoskelet.* **2015**, 7, 25–35, doi:10.2147/CHC.S71852.
144. Hogan, B.; Babataheri, A.; Hwang, Y.; Barakat, A.I.; Husson, J. Characterizing Cell Adhesion by Using Micropipette Aspiration. *Biophysj* **2015**, 109, 209–219, doi:10.1016/j.bpj.2015.06.015.
145. Yousafzai, M.S.; Coceano, G.; Mariutti, A.; Ndoye, F.; Amin, L.; Niemela, J.; Bonin, S.; Scoles, G.; Cojoc, D. Effect of neighboring cells on cell stiffness measured by optical tweezers indentation. *J. Biomed. Opt.* **2016**, 21, 057004, doi:10.1117/1.jbo.21.5.057004.
146. Jing, P.; Liu, Y.; Keeler, E.G.; Cruz, N.M.; Freedman, B.S.; Lin, L.Y. Optical tweezers system for live stem cell organization at the single-cell level. *Biomed. Opt. Express* **2018**, 9, 771, doi:10.1364/boe.9.000771.
147. Grady, M.E.; Composto, R.J.; Eckmann, D.M. Cell elasticity with altered cytoskeletal architectures across multiple cell types. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2016**, 61, 197–207, doi:10.1016/j.jmbbm.2016.01.022.
148. Ketene, A.N.; Schmelz, E.M.; Roberts, P.C.; Agah, M. The effects of cancer progression on the viscoelasticity of ovarian cell cytoskeleton structures. *Nanomedicine Nanotechnology, Biol. Med.* **2012**, 8, 93–102, doi:10.1016/j.nano.2011.05.012.

149. Neugebauer, U.; Ręsch, P.; Schmitt, M. On the Way to Nanometer-Sized Information of the Bacterial Surface by Tip-Enhanced Raman Spectroscopy. *ChemPhysChem* **2006**, *7*, 1428–1430, doi:10.1002/cphc.200600173.
150. Böhme, R.; Cialla, D.; Richter, M.; Ro, P. Biochemical imaging below the diffraction limit – probing cellular membrane related structures by tip-enhanced Raman spectroscopy (TERS). *J. Biophotonics* **2010**, *3*, 455–461, doi:10.1002/jbio.201000030.
151. Pogoda, K. Rola sił mechanicznych generowanych przez macierz zewnątrzkomórkową w rozwoju raka prostaty. Rozprawa doktorska. *Instytut Fizyki Jądrowej* **2015**, 1–123.
152. Moffitt, J.R.; Chemla, Y.R.; Smith, S.B.; Bustamante, C. Recent advances in optical tweezers. *Annu. Rev. Biochem.* **2008**, *77*, 205–228, doi:10.1146/annurev.biochem.77.043007.090225.
153. Wang, Y.; Irudayaraj, J. Surface-enhanced Raman spectroscopy at single-molecule scale and its implications in biology. *Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci.* **2013**, 368, doi:10.1098/rstb.2012.0026.
154. Allison, D.P.; Mortensen, N.P.; Sullivan, C.J.; Doktycz, M.J. Atomic force microscopy of biological samples. *Wiley Interdiscip. Rev. Nanomedicine Nanobiotechnology* **2010**, *2*, 618–634, doi:10.1002/wnan.104.
155. Leite, F.L.; Bueno, C.C.; Da Róz, A.L.; Ziemath, E.C.; Oliveira, O.N. Theoretical models for surface forces and adhesion and their measurement using atomic force microscopy; *Int. J. Mol. Sci.* **2012**; *13* (10); 12773-12856; doi: 10.3390/ijms131012773.
156. Johnson, D.; Hilal, N.; Bowen, W.R. Basic principles of atomic force microscopy; *Elsevier Ltd*, **2009**; ISBN 9781856175173.
157. Francis, L.W.; Lewis, P.D.; Wright, C.J.; Conlan, R.S. Atomic force microscopy comes of age. *Biol. cell* **2010**, *102*, 133–143, doi:10.1042/BC20090127.
158. Poon, C.Y.; Bhushan, B. Comparison of surface roughness measurements by stylus profiler, AFM and non-contact optical profiler. *Wear* **1995**, *190*, 76–88, doi:10.1016/0043-1648(95)06697-7.
159. Yamanaka, T.; Fang, S.J.; Lin, H.C.; Snyder, J.P.; Helms, C.R. Correlation between inversion layer mobility and surface roughness measured by AFM. *IEEE Electron Device Lett.* **1996**, *17*, 178–180, doi:10.1109/55.485166.
160. McKeown, T.A.; Moss, S.T.; Jones, E.B.G. Atomic force and electron microscopy of sporangial wall microfibrils in *Linderina pennisporea*. *Mycol. Res.* **1996**, *100*, 821–826, doi:10.1016/S0953-7562(96)80028-1.

161. Kaminskyj, S.G.W.; Dahms, T.E.S. High spatial resolution surface imaging and analysis of fungal cells using SEM and AFM. *Micron* **2008**, 39, 349–361, doi:10.1016/j.micron.2007.10.023.
162. Lin, Y.; Wang, J.; Wan, L.J.; Fang, X.H. Study of fibrinogen adsorption on self-assembled monolayers on Au(1 1 1) by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **2005**, 105, 129–136, doi:10.1016/j.ultramic.2005.06.028.
163. Thundat, T.; Allison, D.P.; Warmack, R.J.; Ferrell, T.L. Imaging isolated strands of DNA molecules by atomic force microscopy. *Ultramicroscopy* **1992**, Vol. 42–44, 1101–1106, doi:10.1016/0304-3991(92)90409-D.
164. Graham, H.K.; Hodson, N.W.; Hoyland, J.A.; Millward-Sadler, S.J.; Garrod, D.; Scothern, A.; Griffiths, C.E.M.; Watson, R.E.B.; Cox, T.R.; Erler, J.T.; et al. Tissue section AFM: In situ ultrastructural imaging of native biomolecules. *Matrix Biol.* **2010**, 29, 254–260, doi:10.1016/j.matbio.2010.01.008.
165. Sokolov, I. Atomic Force Microscopy in Cancer Cell Research. in: *Cancer Nanotechnology*. American Scientific Publishers' Inc, **2007**, 1, 1–17. ISBN: 1-58883-071-3.
166. Sirghi, L. Atomic Force Microscopy indentation of living cells. in: *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education, FORMATEX* **2010**, 4, 433–440. ISBN: 978-84-614-6189-9.
167. AFM Study shows old Cells Lose Their Elasticity. *APS News* 2004, 13, 5, 1–3, <https://www.aps.org/publications/apsnews/200405/elasticity.cfm>, dostęp dnia 6.09.2021.
168. Mikroskop sił atomowych AFM. *Instrukcje AGH*, 2010. <https://home.agh.edu.pl/~kmr/instrukcje/afm.pdf>, dostęp z dnia 21.06.2021.
169. Barattin, R.; Voyer, N. Chemical modifications of AFM tips for the study of molecular recognition events. *Chem. Commun.* **2008**, 13, 1513–1532, doi:10.1039/b614328h.
170. Kokavecz, J.; Mechler, A. Spring constant of microcantilevers in fundamental and higher eigenmodes. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **2008**, 78, 1–4, doi:10.1103/PhysRevB.78.172101.
171. NT-MDT Spectrum Instruments AFM, SNOM, TERS probes, test samples & calibration gratings. <http://www.ntmdt-tips.com>, dostęp z dnia 20.06.2021.
172. Lehenkari, P.P.; Charras, G.T.; Nykänen, A.; Horton, M.A. Adapting atomic force microscopy for cell biology. *Ultramicroscopy* **2000**, 82, 289–295, doi:10.1016/S0304-3991(99)00138-2.
173. Itoh, H.; Fujimoto, T.; Ichimura, S. Tip characterizer for atomic force microscopy. *Rev. Sci. Instrum.* **2006**, 77, 103704, doi:10.1063/1.2356855.

174. Wu, S. Piezoresponse force microscopy. Application note. *Agil. Technol.* <https://www.agilent.com/cs/library/applications/5989-7611.pdf>, dostęp dnia 10.09.2021.
175. Curie, J.; Curie, P. Développement par compression de l'électricité polaire dans les cristaux hémihédres à faces inclinées. *Bull. la Société Minéralogique Fr.* **1880**, 3, 90–93.
doi: 10.3406/bulmi.1880.1564.
176. Habibullah, H. 30 Years of atomic force microscopy: Creep, hysteresis, cross-coupling, and vibration problems of piezoelectric tube scanners. *Meas. J. Int. Meas. Confed.* **2020**, 159,
doi:10.1016/j.measurement.2020.107776.
177. Leite, F.L.; Herrmann, P.S.P. Application of atomic force spectroscopy (AFS) to studies of adhesion phenomena : a review. *Journal of Adhesion Science and Technology* **2012**, 19, 37–41,
doi: 10.1080/01694243.2021.1898859.
178. Holscher, H.; Falter, J.; Schirmeisen, A. Atomic force microscopy and spectroscopy. in: Characterization of Materials. *Adv. Imag. Electron Phys.* **2012**, 2290–2302.
doi:10.1002/0471266965.com150.
179. Seo, Y.; Jhe, W. Atomic force microscopy and spectroscopy. *Reports Prog. Phys.* **2008**, 71,
doi:10.1088/0034-4885/71/1/016101.
180. Arce, F.T.; Whitlock, J.L.; Birukova, A.A.; Birukov, K.G.; Arnsdorf, M.F.; Lal, R.; Garcia, J.G.N.; Dudek, S.M. Regulation of the micromechanical properties of pulmonary endothelium by S1P and thrombin: Role of cortactin. *Biophys. J.* **2008**, 95, 886–894,
doi:10.1529/biophysj.107.127167.
181. JPK Instruments JPK Instruments Technical Note. pp. 1–8.
182. Jones, R.; Hodges, C.S. Applications of Atomic Force Microscopy to Granular Materials : Inter-particle forces in air. in: Advances in granular materials: Fundamentals and applications; *Royal Society of Chemistry*, **2003**.
183. Lopeza, J.I.; Kang, I.; Youb, W.; McDonaldb, D.M.; Weaver, V.M. In situ force mapping of mammary gland transformation. *Integr Biol* **2011**, 3, 910–921,
doi:10.1039/c1ib00043h.
184. Caluori, G.; Pribyl, J.; Pesl, M.; Cruz, J.O. La; Nardone, G.; Skladal, P.; Forte, G. Advanced and Rationalized Atomic Force Microscopy Analysis Unveils Specific Properties of Controlled Cell Mechanics. *Front. Physiol.* **2018**, 9: 1121,
doi:10.3389/fphys.2018.01121.

185. Massou, S.; Vicente, F.N.; Wetzel, F.; Mehidi, A.; Strehle, D.; Leduc, C.; Voituriez, R.; Rossier, O.; Nassoy, P.; Giannone, G. Cell stretching is amplified by active actin remodelling to deform and recruit proteins in mechanosensitive structures. *Nat. Cell Biol.* **2020**, *22*, 1011–1043, doi:10.1038/s41556-020-0548-2.
186. Stabley, D.R.; Jurchenko, C.; Marshall, S.S.; Salaita, K.S. Visualizing mechanical tension across membrane receptors with a fluorescent sensor. *Nat. Methods* **2012**, *9*, 64–67, doi:10.1038/nmeth.1747.
187. Ionta, M.; Rosa, M.C.; Almeida, R.B.; Freitas, V.M.; Rezende-Teixeira, P.; Machado-Santelli, G.M. Retinoic acid and cAMP inhibit rat hepatocellular carcinoma cell proliferation and enhance cell differentiation. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2012**, *45*, 721–729, doi:10.1590/S0100-879X2012007500087.
188. Raudenska, M.; Kratochvilova, M.; Vicar, T.; Gumulec, J.; Balvan, J.; Polanska, H.; Pribyl, J.; Masarik, M. Cisplatin enhances cell stiffness and decreases invasiveness rate in prostate cancer cells by actin accumulation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, 1–12, doi:10.1038/s41598-018-38199-7.
189. Nguyen, T.L.; Polanco, E.R.; Patananan, A.N.; Zangle, T.A.; Teitell, M.A. Cell viscoelasticity is linked to fluctuations in cell biomass distributions. *Sci. Rep.* **2020**, *10*, 1–11, doi:10.1038/s41598-020-64259-y.
190. Efremov, Y.M.; Dokrunova, A.A.; Efremenko, A. V.; Kirpichnikov, M.P.; Shaitan, K. V.; Sokolova, O.S. Distinct impact of targeted actin cytoskeleton reorganization on mechanical properties of normal and malignant cells. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* **2015**, *1853*, 3117–3125, doi:10.1016/j.bbamcr.2015.05.008.
191. McDougal, R.A.; Morse, T.M.; Carnevale, T.; Marengo, L.; Wang, R.; Migliore, M.; Miller, P.L.; Shepherd, G.M.; Hines, M.L. Twenty years of ModelDB and beyond: building essential modeling tools for the future of neuroscience. *J. Comput. Neurosci.* **2017**, *42*, 1-10 doi:10.1007/s10827-016-0623-7.
192. Ladjal, H.; Hanus, J.L.; Pillarisetti, A.; Keefer, C.; Ferreira, A.; Desai, J.P. Reality-based real-time cell indentation simulator. *IEEE/ASME Trans. Mechatronics* **2012**, *17*, 239–250, doi:10.1109/TMECH.2010.2091010.
193. Liu, Y.; Mollaeian, K.; Ren, J. Finite element modeling of living cells for AFM indentation-based biomechanical characterization. *Micron* **2019**, *116*, 108–115, doi:10.1016/j.micron.2018.10.004.
194. Lim, C.T.; Zhou, E.H.; Quek, S.T. Mechanical models for living cells - A review. *J. Biomech.* **2006**, *39*, 195–216, doi:10.1016/j.jbiomech.2004.12.008.

195. Charras, G.T.; Horton, M.A. Determination of cellular strains by combined atomic force microscopy and finite element modeling. *Biophys. J.* **2002**, *83*, 858–879, doi:10.1016/S0006-3495(02)75214-4.
196. Guilak, F.; Mow, V.C. The mechanical environment of the chondrocyte: A biphasic finite element model of cell-matrix interactions in articular cartilage. *J. Biomech.* **2000**, *33*, 1663–1673, doi:10.1016/S0021-9290(00)00105-6.
197. Kennassi, E. El; Kennassi, F. El Nano-Mechanical Eukaryotic Cell Behavior by Finite Element Modeling. *Intern. J. of Analy. Exper. and Fin. Ele. Anal.*, **2020**, *7*, 3,61-67
doi:10.26706/ijaefea.3.7.20200603.
198. Jamali, Y.; Azimi, M.; Mofrad, M.R.K. A sub-cellular viscoelastic model for cell population mechanics. *PLoS One* **2010**, *5*,
doi:10.1371/journal.pone.0012097.
199. Flormann, D.A.D.; Kaub, K.H.; Vesperini, D.; Schu, M.; Anton, C.; Pohland, M.O.; Kainka, L.; Montalvo Bereau, G.; Janshoff, A.; Hawkins, R.J.; et al. The role of actin and myosin II in the cell cortex of adhered and suspended cells. *bioRxiv* **2021**, *49*,
doi:10.1101/2021.08.03.454901.
200. Frixione, E.; Hernández, M. Structural Organization of Cells - The Cytoskeleton. in: *Comprehensive Biotechnology. Elsevier B.V.*, **2011**; Vol. 1; 367-381
doi:10.1016/B978-0-08-088504-9.00039-8.
201. Sandersius, S.A.; Newman, T.J. Modeling cell rheology with the Subcellular Element Model. *Phys. Biol.* **2008**, *5*, 1 :015002,
doi:10.1088/1478-3975/5/1/015002.
202. Kmiotek, M. Przegląd Solverów Numerycznych Stosowanych w Mechanice Obliczeniowej. *Sci. Bull. Chełm* **2008**, *1*, 151–158.
203. McGarry, J.G.; Prendergast, P.J.; Ashton, B.; Klein-Nulend, J. A three-dimensional finite element model of an adherent eukaryotic cell. *Eur. Cells Mater.* **2004**, *7*, 27–34,
doi:10.22203/eCM.v007a03.
204. Wang, L.; Wang, L.; Xu, L.; Chen, W. Finite Element Modelling of Single Cell Based on Atomic Force Microscope Indentation Method. *Comput. Math. Methods Med.* **2019**,
doi:10.1155/2019/7895061.
205. Gladilin, E.; Micoulet, A.; Hosseini, B.; Rohr, K.; Spatz, J.; Eils, R. 3D finite element analysis of uniaxial cell stretching: from image to insight. *Phys Biol.* **2007**, *4*(2),104-13,
doi:10.1088/1478-3975/4/2/004.

206. Forouzesh, E.; Goel, A.; MacKenzie, S.A.; Turner, J.A. In vivo extraction of Arabidopsis cell turgor pressure using nanoindentation in conjunction with finite element modeling. *Plant J.* **2013**, *73*, 509–520, doi:10.1111/tpj.12042.
207. Ding, Y.; Xu, G.K.; Wang, G.F. On the determination of elastic moduli of cells by AFM based indentation. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 1–8, doi:10.1038/srep45575.
208. Bidhendi, A.J.; Geitmann, A. Finite element modeling of shape changes in plant cells. *Plant Physio.* **2018**, *176* (1), 41–56, doi:10.1104/pp.17.01684.
209. Zhao, X.; Zhong, Y.; Ye, T.; Wang, D.; Mao, B. Discrimination Between Cervical Cancer Cells and Normal Cervical Cells Based on Longitudinal Elasticity Using Atomic Force Microscopy. *Nanoscale Res. Lett.* **2015**, *10*, doi:10.1186/s11671-015-1174-y.
210. Madzvamuse, A.; Kiplangat, B.K. Integrating Actin and Myosin II in a Viscous Model for Cell Migration. *Front. Appl. Math. Stat.* **2020**, *6*, 13–15, doi:10.3389/fams.2020.00026.
211. Hu, J.; Jafari, S.; Han, Y.; Grodzinsky, A.J.; Cai, S.; Guo, M. Size- and speed-dependent mechanical behavior in living mammalian cytoplasm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2017**, *114*, 9529–9534, doi:10.1073/pnas.1702488114.
212. Wei, F.; Yang, H.; Liu, L.; Li, G. A novel approach for extracting viscoelastic parameters of living cells through combination of inverse finite element simulation and Atomic Force Microscopy. *Comput. Methods Biomech. Biomed. Engin.* **2017**, *20*, 373–384, doi:10.1080/10255842.2016.1233403.
213. Hermanowicz, P.; Sarna, M.; Burda, K.; Gabryś, H. AtomicJ: An open source software for analysis of force curves. *Rev. Sci. Instrum.* **2014**, *85*, 063703 doi:10.1063/1.4881683.
214. Das, S.; Chary, S.; Yu, J.; Tamelier, J.; Turner, K.L.; Israelachvil, J.N. JKR Theory for the Stick–Slip Peeling and Adhesion Hysteresis of Gecko Mimetic Patterned Surfaces with a Smooth Glass Surface. *Langmuir* **2013**, *29*, 15006–15012, doi:10.1021/la403420f.
215. Zhang, L.; Ru, C.Q. A refined JKR model for adhesion of a rigid sphere on a soft elastic substrate. *J. Appl. Mech. Trans. ASME* **2019**, *86*, 1–11, doi:10.1115/1.4042574.
216. Cárdenas-Pérez, S.; Chanona-Pérez, J.J.; Méndez-Méndez, J.V.; Arzate-Vázquez, I.; Hernández-Varela, J.D.; Vera, N.G. Recent advances in atomic force microscopy for assessing the nanomechanical properties of food materials. *Trends Food Sci. Technol.* **2019**, *87*, 59–72, doi:10.1016/j.tifs.2018.04.011.

217. Bruker Nano Surfaces Nanomechanical Characterization of Biological Cells with the PeakForce QNM AFM Method. *AZO nano*, **2013**.

Streszczenie

Choroby endometrium dotyczą wielu kobiet na całym świecie, stanowiąc jeden z czynników istotnie ograniczających płodność. Zaburzeniom funkcjonowania macicy towarzyszą zarówno zmiany strukturalne jak i hormonalne, jednocześnie mogą się one wiązać ze zmianami właściwości mechanicznych tkanki endometrium.

Niniejsza rozprawa ma na celu zaprezentowanie wyników badań dotyczących modyfikacji elastyczności tkanki endometrium w kontekście zmian patologicznych występujących w obrębie tkanki endometrium, jak również ich związku z płodnością. Przedmiotem badań były fragmenty endometrium pochodzące od pacjentek ze zdiagnozowanymi chorobami endometrium, w tym niepłodnością. Technika spektroskopii sił, wykorzystana do pomiaru właściwości mechanicznych tkanek, dostarczyła informacji pozwalających na wykazanie powiązania zmian wartości modułu Younga z rozwojem polipów i mikropolipów w macicy. Stwierdzono ponadto możliwość występowania zależności wartości modułu Younga od płodności.

Opracowano również model indentacji komórki opisany zmodyfikowanym równaniem Hertza, który uwzględnia obecność korteksu komórkowego. Rozwiązanie modelu metodą elementów skończonych umożliwiło uzyskanie wyników odzwierciedlających odpowiedź komórki na nacisk sferycznym indenterem.

Mikroskopia sił atomowych jest techniką o dużym potencjale wykorzystania jej jako metody uzupełniającej diagnostykę chorób endometrium.

Title in English

Atomic Force Microscopy in the diagnosis of uterine diseases based on the mechanical properties of endometrial tissue.

Abstract

Endometrial diseases affect many women around the world. It is one of the significantly limiting fertility factors. Uterine dysfunctions are related to structural and hormonal changes, but they may also be associated with changes in the mechanical properties of the endometrial tissue.

This dissertation aims to present the research results on the endometrial tissue elasticity modification in the context of pathological changes occurring within the endometrial tissue and their possible relationship with fertility. The research material, a fragment of endometrial tissue, was taken from patients who suffer from different endometrial diseases, including infertility. Force spectroscopy was applied to measure the mechanical properties of tissues. This technique allowed the correlation between changes in the value of Young's modulus and the development of polyps and micropolyps in the uterus determination. Moreover, it was found that the value of Young's modulus may depend on fertility.

A cell indentation model was developed to describe a cell with a cortex by a modified Hertz equation. The solution of this model obtained with the finite element method allowed for getting the results reflecting the cell's response to spherical indenter exerting pressure.

Atomic force microscopy has a great potential to use as a complementary diagnostic method for endometrial diseases.