

Data: Genewa, 30 sierpnia, 2022

L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Katedra Biofizyki
Instytut Fizyki
Uniwersytet M. Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5
(wiesiek@umk.pl)

**RECENZJA rozprawy doktorskiej
Mgr Magdaleny Giergiel pt.**

**“Badanie komórek śródbłonka metodami spektroskopii sił atomowych”
(“*The study of endothelial cells by means of atomic force microscopy*”)**

Ciekawość niemal każdego urodzonego badacza zaczyna się od pytania „A co jest w środku”. Metody fizyczne od lat skutecznie pozwalają znaleźć odpowiedzi na to ważne pytanie w odniesieniu do wielu materiałów. Szczególne znacznie mają dla nas informacje o zawartości ludzkiego ciała i komórek je tworzących. Lekarze potrafią dotykiem wykrywać groźne guzy. Technika mikroskopii sił atomowych (AFM), opracowana z lat 80-tych (PRL 1986) i doceniona nagrodą Nobla, opiera się na podobnej zasadzie: delikatne ostrze będące zwykle w kontakcie z powierzchnią badanej próbki zdaje sprawę z jej topografii oraz, przy spełnieniu pewnych warunków, elastyczności. Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska pani mgr Magdaleny Giergiel dotyczy badań tą ultraczułą techniką AFM ważnych medycznie obiektów jakimi są komórki śródbłonka ssaków. U człowieka śródbłonek stanowi około 1% masy ciała i obejmuje obszar 5000 m². Pomiary ilościowe elastyczności komórek śródbłonka mogą wnieść ważne informacje, fundamentalne do zrozumienia procesów fizjologicznych i patologii, a także, mamy nadzieję, doprowadzić w przyszłości do nowych metod diagnostycznych.

Idea AFM jest bardzo prosta, niestety pomiary ilościowe na materiale biologicznym są wysoce nietrywialne. Doktorantka w swojej rozprawie przedstawiła dwa ciekawe pomysły, które moim zdaniem wnoszą zauważalny wkład do nauk fizycznych w tym stosunkowo wąskim obszarze: (1) zaproponowała wykorzystanie pewnego ulepszanego modelu opisu elastyczności komórek, dającego nowe możliwości interpretacji wyników pomiarów tzw. widm siłowych AFM (2) Opracowała opartą na sztucznej inteligencji metodę do niemal automatycznego interpretowania obrazów AFM w ważnej klasie tkanek. Badania, w mojej ocenie, mają charakter interdyscyplinarny, dotyczą bardzo aktualnej i ważkiej tematyki, zatem dobór problemów badawczych uważam za bardzo trafny. Swoje prace prowadzące do powstania rozprawy pani mgr M. Giergiel realizowała pod opieką prof. dr hab. Jerzego Koniora i dr Bartłomieja Zapotocznego (promotor pomocniczy) na Wydziale Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej UJ. Wkład doktorantki polegał głównie na opracowaniu metod analizy danych z AFM, ale przeprowadziła Ona też samodzielnie szereg pomiarów, m.in. na mikroskopie AFM JPK.

Praca doktorska napisana jest w języku angielskim (b. dobrym), składa się z Oświadczenia, Streszczeń (PL, ENG), Wykazu trzech publikacji z doktoratu, 5 krótkich rozdziałów w przystępny sposób omawiających poszczególne zagadnienia (R2 – podstawowe pojęcia, R3 – opis celu badań, R4 streszczenie głównych wyników, R5 podsumowanie i przedstawienie głównych wniosków). Wykaz literatury do tej części obejmuje 96 pozycji, część „autorska” ma 23 strony. Za nim mamy dwustronicowy wykaz dodatkowych osiągnięć doktorantki oraz zasadniczą część: Reprinty trzech publikacji wraz suplementami.

P1. Application of a layered model for determination of the elasticity of biological systems

M Rusaczonek (Giergiel), B Zapotoczny, M Szymonski, J Konior

Micron (2019) 124, 102705 (7 pp)

P2. Endothelial glycocalyx detection and characterization by means of atomic force spectroscopy: Comparison of various data analysis approaches

M Giergiel, KE Malek-Zietek, J Konior, M Targosz-Korecka

Micron (2021) 151, 103153 (9pp)

P3. AFM image analysis of porous structures by means of neural networks

M Giergiel, B Zapotoczny, I Czyzyska-Cichon, J Konior, M Szymonski

Biomedical Signal Processing and Control (2022) 71, 103097 (9pp)

Każdy artykuł poprzedzony jest opisem wkładu doktorantki do danego dzieła. W oparciu o te dane mogłem dość wyraźnie ocenić co wniosła pani mgr M.Giergiel, a co inni autorzy. Muszę jednak zauważyć, że w innych ostatnio recenzowanych doktoratach złożonych w opublikowanych artykułach naukowych załączano również oświadczenia głównych współautorów prac (wzorem procedury habilitacyjnej). Nie mam wątpliwości, że wkład doktorantki był dominujący, we wszystkich trzech pracach jest ona pierwszym i korespondującym autorem.

Streszczenia rozprawy są konkretne i dobrze napisane, właściwie zdają sprawę z jej zawartości.

Dobrym pomysłem jest podanie na wstępie opisu struktury rozprawy. Rozdziały R2-R5 są napisane jasno, zwięźle i koncentrują się na sprawach faktycznie związanych z istotą prowadzonych badań. Przegląd literatury jest stosunkowo obszerny (96 pozycji), ale wg mnie mógłby być obszerniejszy i tym samym bardziej przydatny nowym pokoleniom studentów zajmujących się AFM. Np., poza poz. [57] nie zauważyłem żadnego komentarza na temat pionierskich badań elastyczności komórek nowotworowych metodami AFM prowadzonych w Krakowie na UJ/IFJ zainicjowanych m.in. przez prof. M. Lekką (praca „*Elasticity of normal and cancerous human bladder cells studied by scanning force microscopy*”, M Lekka, P Laidler, D Gil, J Lekki, Z Stachura, AZ Hrynkiwicz; *European Biophysics Journal* 28 (4) (1999), 312-316 ma ponad 700 cytowań). W opisie glioxalu ważny nowy przegląd to „*Nanomechanics of the Endothelial Glycocalyx From Structure to Function*”, Zülfi Cem Cosgun et al. (*The American Journal of Pathology*, Vol. 190, No. 4, April 2020), ze starszej literatury warto byłoby wg mnie zacytować też pracę : *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 301: L353–L360, 2011 na temat pomiarów sztywności śródbłoka.

Opisy modeli teoretycznych krzywych siła-wydłużenie, opis metody sieci neuronowych w zastosowaniu do analizy obrazów AFM czy ogólna dyskusja wyników są może trochę skrótowe, ale wg mnie odpowiednie. Dowodzą rozumienia tematu i dobrego opanowania warsztatu badawczego związanego z sieciami neuronowymi i modelowaniem danych AFM. Właściwe jest też dodanie uwag podkreślających ograniczenia stosowanych modeli oraz pewnego szerszego kontekstu – do czego mogą się przydać opracowane programy.

Wadą tego opisu jest całkowite pominięcie (przynajmniej ja nie zauważyłem) faktu, że w przypadku komórek musimy też uwzględnić lepkość materiału przy badaniu ich właściwości mechanicznych przy pomocy nanoindentacji. W literaturze często stosowane są nie tylko proste modele Hertza czy Sneddona ale też modele Kelvina-Voighta-Maxwella (zob. np. Shada Abuhattum et al., “An explicit model to extract viscoelastic properties of cells from AFM force-indentation curves”, iScience 25, 104016, April 15, 2022)

Poniżej przedstawiam krytyczne omówienie publikacji P1,P2,P3 tj. zasadniczej części rozprawy.

P1.

W pracy P1 zawarta jest słuszna teza, iż zrozumienie tkanek i ich znaczenia fizjologicznego wymaga poprawnego (ilościowego) określenia ich właściwości mechanicznych. Często stosowany model Hertza (jeszcze z XIX wieku) opiera się na ostrych założeniach, w zasadzie niemożliwych do całkowitego spełnienia w materiałach biologicznych, które np. są silnie niejednorodne. Jasno przedstawiona jest konieczność wyjścia poza ten model w przypadku biofizycznych badań AFM komórek. Oryginalnym pomysłem jest wykorzystanie do charakteryzacji materiału biologicznego tzw. modelu Kovaleva, który ma więcej parametrów i lepiej oddaje mechanikę złożonego obiektu badań. Model ten wprowadzono w roku 2004 do opisu warstw polimerowych, zakłada się że mają one różne moduły Younga E_0 i E_1 , zaś są połączone strefą o zmiennym E . Przedmiotem badań były mysie komórki zatokowe śródbłonna z wątroby (*Liver sinusoidal endothelial cells*), która są delikatne (ok 2 mikrometry grubości), częściowo pokryte okienkami (porami, *fenestrations*) i poznanie ich nanomechaniki może mieć duże znaczenie medyczne. Autorzy opracowali mapy (8x8) parametrów elastyczności E_0 i E_1 i pokazali, że nowe podejście pozwala zauważyć te zmienne cechy materiału, które są niewidoczne w przypadku użycia modelu Hertza/Sneddona. Elastyczności głębszych warstw (obszar jądra) w przypadku komórek myszy hodowanych na diecie wysokotłuszczowej i normalnej były różne.

Publikacja ta jest moim zdaniem napisana bardzo „zgrabnie”, dobrze osadzona w literaturze. Liczba wyników nie jest imponująca, zauważone efekty można by krytykować (czy w ogóle są, zważywszy na duże oszacowane przedziały błędów (rys. 9), ale to ma być z założenia tylko ilustracja pomysłu wykorzystania modelu Kovaleva w biologii.

W trakcie obrony byłbym ciekaw opinii doktorantki w następujących kwestiach:

- 1) Czy fakt, że pierwotny model został opracowany dla ultracienkich warstw, a tutaj mamy jednak znacznie grubsze obiekty, nie wprowadza jakiegoś zaburzenia?
- 2) Jak można wytłumaczyć silne odstępstwo wyników pomiarów zależności parametru E od głębokości indentacji (dla małych wartości δ) przedstawione na rys. 4 pracy P1?

P2.

Publikacja P2 dotyczy zbliżonej tematyki. Technika AFM została wykorzystana przez autorów do pomiarów glikokaliksu – warstwy węglowodanowej (proteoglikany, glikozaminoglikany, glikoproteiny, itp. związki) pokrywającej śródbłonek (dalej - eGlx). Warstwa ta jest niezmiernie ważna do prawidłowego funkcjonowania, m.in., naczyń krwionośnych i jelit, tutaj badano komórki z ludzkiej aorty. Intuicja podpowiada, że „najeżone” cukry o grubości warstwy ok 0.5-0.7 mikrometra, mają inną sztywność niż same komórki śródbłonna. Doktorantka *et al.* porównali cztery modele elastyczności

przyjęte do analizy danych uzyskanych dla 3 zestawów komórek – z pełnym eGlx, z częściowo usuniętym, i niemal pozbawionych enzymatycznie eGlx. W zasadzie wszystkie modele wychwytyją silną zmianę właściwości materiału biologicznego poddanego modyfikacji glikokaliksu. W publikacji nie ma rekomendacji, który model powinien być stosowany w rutynowych i masowych badaniach, Ciekawe, czy są może nowe i niepublikowane dane, które przemawiają za wybraniem jednego z nich (? Koveleva)? W publikacji nie ma też żadnego komentarza na temat lepkości tak ciekawego środowiska jak glikokaliks, czy jest ona we wszystkich trzech próbkach stała? Czy nie ma wpływu na przebiegi krzywych siła-głębokość indentacji? Nie zauważyłem też informacji o tym, czy wyniki tej publikacji P2 – porównanie modeli- mogą zależeć o rodzaju przyjętej do pomiarów sondy AFM.

Publikacja ta dla środowiska fizyków zajmujących się nanomechaniką jest z pewnością ważna i ciekawa. Zastosowano cztery dość popularne modele elastyczności do spójnych danych zebranych w tym samym laboratorium. To, że jakościowo wyniki są zgodne, nie było takie oczywiste przed wykonaniem tych analiz. Teraz nasz arsenał metod badawczych, dzięki, m.in., wysiłkom doktorantki, jest lepiej rozpoznany. Należy zaznaczyć, że same (niełatwe) pomiary i eksperymenty wykonywały inne osoby, jednak analizy w modelu dwuwarstwowym oraz porównanie modeli wykonała pani mgr M. Giergiel.

P3.

Mam wrażenie, że publikacja P3 poświęcona analizie obrazów AFM wykonanych dla materiałów porowatych w dłuższym okresie zdobędzie najwięcej cytowań. Praca ta, opublikowana w specjalistycznym czasopiśmie *Biomedical Signal Processing nad Control* (IF=5.6), prezentuje metodę automatycznego wykrywania i w pewnym stopniu charakteryzowania okienek/porów (*fenestrations*) obecnych na powierzchni niektórych komórek. Metoda ta, oparta na rozpoznawaniu obrazów przy pomocy algorytmu opartego na sieci neuronowej ma bardzo dobrą skuteczność (na poziomie 90%) i zastępuje uciążliwe „ręczne” liczenie „dziurek w całym” zlecane zwykle młodszemu personelowi naukowemu. Liczenie do dziesięciu baranów przed snem może być nawet przyjemne i pożyteczne, ale liczenie tysięcy porów w obrazach AFM komórki już niekoniecznie. Dlatego z uznaniem odnoszę się do pomysłu i opracowania programu automatyzującego skutecznie tę pożyteczną dla nauki pracę. W tej publikacji silnie rysuje się interdyscyplinarność badań prowadzonych przez doktorantkę. Badane są obrazy ważnych obiektów biologicznych – czyli komórek śródbłonna (biologia). Badane są pory, poprzez obrazowanie AFM (fizyka), które mogą być wskaźnikiem stanów patologicznych (medycyna). Stosowane są zaawansowane algorytmy sztucznej inteligencji (informatyka). Szersze wykorzystanie opracowanych programów przyniesie oszczędność ludzkiego czasu i podniesie wydajność badań (ekonomia). Oczywiście można dyskutować, czy nie da się zrobić jeszcze efektywniejszej architektury sieci (da się) czy zbiory treningowe nie były za małe (były małe) i czy nie zachodzi zjawisko „przeuczenia” – trudne do uniknięcia. Mnie do wysokiej oceny tej akurat publikacji przekonuje duży wkład intelektualny – wysiłek w wymyślanie takich warstw czy funkcji kary, które najlepiej służą zadanemu celowi. Tego typu badania nie są niestety „black-boxowe” i trzeba się nieźle natrudzić i poeksperymentować, by otrzymać przyzwoitą sprawność systemu rozpoznawania cech na obrazie. Tutaj, niestety, nie widzę wisienki na torcie, tj. informacji, że opracowana metoda jest na tyle stabilna, że można wystawić program do domeny publicznej po to, by każdy mógł spróbować swoich sił w liczeniu „otworów” w błonach czy innych materiałach porowatych.

Od strony redakcyjnej recenzowana rozprawa robi b. dobre wrażenie. Nie ma w zasadzie literówek. Jakość rysunków jest bardzo dobra. Przydałby się może osobny wykaz skrótów, np. w omówieniu rozprawy eGlx pojawia się „znikąd”.

KONKLUZJA

Pani mgr Magdalena Giergiel przedstawiła bardzo dobrą, interdyscyplinarną rozprawę doktorską. Zastosowała po raz pierwszy ulepszony model elastyczności komórek i zastosowała go do interpretacji elastyczności ważnej części organizmów żywych – śródbłónka. Wykazała się dużą biegłością w analizie numerycznej obrazów biologicznych z AFM, opracowała narzędzie oparte na sieciach neuronowych ułatwiające analizę danych i otwierające nowe możliwości badawcze. Wyniki doktorantki są wartościowe, mogą być podstawą dalszych publikacji. Doktorantka prezentowała rezultaty badań na wielu konferencjach i ma solidne doświadczenie w prowadzeniu badań naukowych na wysokim poziomie.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Magdaleny Giergiel stanowi rozwiązanie problemu naukowego związanego z naukami fizycznymi. Rozprawa i dorobek publikacyjny dowodzą, że doktorantka potrafi samodzielnie prowadzić badania naukowe w wykorzystaniu technik AFM i programowania, umie pracować w interdyscyplinarnych zespołach naukowych.

Recenzowane dzieło spełnia ustawowe (tj. Ustawa o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki, Dz. U. z 2016 poz. 882) **oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. Wnoszę o dopuszczenie pani magister Magdaleny Giergiel do dalszych etapów postępowania prowadzącego do uzyskania stopnia naukowego doktora w dyscyplinie nauki fizyczne.**

Wiesław Nowak, prof. zw.

