INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKA AKADEMIA NAUK

prof. dr hab. Małgorzata Lekka
Zakład Badań Mikroukładów Biofizycznych
Instytut Fizyki Jądrowej PAN
Radzikowskiego 15, 31-342 Kraków,

Kraków, 14.05.2018

Opinia o pracy doktorskiej

Author: Paweł Hermanowicz

Tytuł rozprawy doktorskiej:

Konstrukcja map właściwości mechanicznych próbek biologicznych w mikroskopii sił atomowych

Przedstawiona do recenzji praca doktorska Pana mgr. Pawła Hermanowicza została wykonana pod kierunkiem prof. dr hab. Haliny Gabryś na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego.

Jednym z najważniejszych kierunków badań mikroskopii sił atomowych (AFM) jest ilościowa ocena własności mechanicznych próbek biologicznych. Technika ta umożliwia nie tylko obserwację powierzchni w trzech wymiarach w sub-nanometrowej skali ale także obrazowanie właściwości nanomechanicznych badanej próbki. Rejestrowane ugięcie dźwigni (ang. *cantilever*) zachodzące pod wpływem sił działających pomiędzy atomami ostrza a atomami tworzącymi badaną powierzchnię pozwala w sposób ilościowy określić zmiany zachodzące w próbce. Badania własności mechanicznych (tj. elastyczności) żywych komórek w środowisku ciekłym są prowadzone od wczesnych lat dziewięćdziesiątych. Uzyskane wyniki pozwalają na stwierdzenie, że zmiany własności mechanicznych pojedynczych komórek są skorelowane ze zmianami chorobowymi. Na szczególną uwagę zasługują choroby nowotworowe, dla których wykazano, że zwiększona deformowalność komórek jest zmianą charakterystyczną nie tylko dla komórek nowotworowych ale także dla komórek pochodzących z zaawansowanych etapów progresji nowotworowej. W ostatnich latach (pierwsze doniesienie literaturowe ukazało się w 2009 roku), mikroskopia sił atomowych została wykorzystana w badaniach elastyczności mięśni myszy chorujących na dystrofię mięśniową Duchenne'a, których deformowalność była znacząco większa od mięśni myszy zdrowych. Kolejne lata przyniosły doniesienia o zastosowaniu tej techniki w badaniu elastyczności wycinków tkanek, co może być pomocne w diagnostyce chorób nowotworowych – np. raka sutka, czy raka prostaty. Pomimo doniesień pokazujących zmiany elastyczności w chorobach nowotworowych i dystrofii mięśniowych, liczba publikacji opisujących zastosowanie AFM w badaniach nad elastycznością tkanek jest mała.

Jedną z przyczyn jest opis teoretyczny własności mechanicznych próbek biologicznych, które są próbkami wysoce niejednorodnymi i nieliniowymi. Na chwilę obecna nie istnieje teoretyczny model pozwalający na ilościowe opis zmian elastyczności komórek

poddanych indentacji. Powszechnie stosowanym modelem jest model Hertz'a, który w swej istocie opisuje deformację dwóch elastycznych kul. Stosowane przybliżenia kształtu naciskającego na komórkę ostrza wyprowadzone przez I.Sneddon'a pozwalają na zgrubne, ilościowe oszacowanie komponenty elastycznej badanej komórki. Model Hertz'a wraz z modyfikacjami Sneddon'a zakłada idealnie elastyczną, izotropową próbkę naciskaną przez osiowosymetryczne ostrze przy założeniu braku sił adhezji w polu kontaktu sonda AFM – powierzchnia próbki. Model ten nie uwzględnia także efektu podłoża, grubości badanej próbki czy obecności naprężeń początkowych. Temat pracy doktorskiej Pana mgr Pawła Hermanowicza wpisuje się i uzupełnia znacząco ten nurt badań. Tytuł pracy *„Konstrukcja map właściwości mechanicznych próbek biologicznych w mikroskopii sił atomowych"*, odzwierciedla także obecny trend mikroskopii AFM skierowany ku obrazowaniu nie tylko topografii powierzchni ale także jej właściwości. Dzięki takiemu podejściu, możliwe jest skorelowanie struktury powierzchni komórki z jej własnościami fizyko-chemicznymi takimi jak elastyczność. Tematyka pracy doktorskiej ma duże znaczenie praktyczne poprzez stworzenie narzędzia pozwalającego na porównanie modeli teoretycznych opisujących mechanikę kontaktu obserwowaną podczas pomiarów za pomocą AFM i wybór takiego, który najlepiej opisuje zmiany elastyczności takich próbek biologicznych jak komórki zwierzęce i roślinne oraz tkanki.

Rozprawa doktorska jest napisana w zasadzie przejrzystym i jasnym językiem umożliwiającym osobie nie posiadającej głębokiej wiedzy zrozumienie tematyki i znaczenia mechaniki kontaktu. Trochę przeszkadza odnoszenie się do późniejszych rozdziałów jak to ma miejsce przykładowo na stronie 73 rozdziału 5 gdzie jest odnośnik do metody obliczeń numerycznych na stronie 83 rozdziału 6. Praca doktorska została ona podzielona na dziesięć rozdziałów. Pierwszy rozdział wprowadza podstawy pomiaru za pomocą mikroskopu sił atomowych oraz aktualny sposób analizy danych. Kolejne rozdziały (2 i 3) wprowadzają podstawowe pojęcia fizyczne oraz zagadnienia mechaniki kontaktu ostrza z powierzchnią próbki, po czym następuje wprowadzenie celów pracy doktorskiej. Cele pracy doktorskiej są opisane w sposób przejrzysty – po zdefiniowaniu celu po czym następuje opis celu (krótkie umotywowanie, sposób realizacji oraz uzyskany wynik). Cele pracy obejmują cztery zagadnienia:

- opracowanie metod pozwalających na wyznaczenie modułu Young'a dla cienkich, linio-sprężystych próbek wspartych na sztywnym podłożu,
- wyprowadzenie równań opisujących wpływ naprężeń początkowych na własności mechaniczne próbek wspartych na sztywnym podłożu dla materiałów Funga i Ogdena,
- wyprowadzenie równań opisujących zależność obciążenia od indentacji próbki cylindrycznej otoczonej sztywną ścianą popartą w dwóch miejscach
- oraz opracowanie narzędzia umożliwiającego bezpośrednie zastosowanie opracowanych modeli kontaktu sondy AFM z powierzchnią próbki.

Kolejne rozdziały 5-9 opisują szczegółowo podstawy fizyczne i mechaniczne proponowanych powyżej wyprowadzeń i zależności w oparciu o rozwiązania analityczne i numeryczne. Praca jest zakończona opisem oprogramowania *AtomicJ* oraz podsumowaniem. Dodatkowo praca jest uzupełniona o zagadnienia matematyczne i wyniki numeryczne przybliżeń Czebyszewa załączone w dodatkach A i B, których obecność jest potrzebna do zrozumienia pracy. Zakończenie pracy obejmuje spis bibliograficzny (223 pozycje) świadczący o rozległych studiach zagadnienia opisu mechaniki kontaktu i zaangażowaniu Doktoranta w tematykę pracy doktorskiej.

Pomimo przejrzystego opisu modeli mechanicznych, podczas czytania pracy nasunęły się następujące uwagi, pytania i komentarze:

- Opis pomiary krzywych „siła-odległość" a tym samym opis działania mikroskopu sił atomowych został potraktowany dosyć skrótowo. Wynikiem tego są dosyć skrótowe sformułowania. Jako, że zrozumienie samej metody jest kluczowe dla zastosowania modeli teoretycznych, z obowiązku recenzenta pozwolę je sobie wymienić:
  a) zdanie *„zasadniczym źródłem sił mierzonych w AFM jest mechaniczny kontakt ostrza z próbką"* (strona 3). Takie sformułowanie niezwykle zawęża opis działania, gdyż mechaniczny kontakt zwykle jest definiowany jako moment kiedy zaczyna działać zasada Pauliego. Mikroskop pozwala na pomiar sił długozasięgowych w odległości nawet kilkudziesięciu czy kilkuset nanometrów ponad powierzchnią próbki,
  b) zdanie *„najważniejszym sposobem badania własności mechanicznych ... jest pomiar obciążenia działającego na ostrze..."* (strona 3) nie jest poprawne gdyż w mikroskopie sił atomowych mierzy się wychylenie sprężynki. Potem obciążenie jest wyliczane jako iloczyn wychylenia sprężynki i stałej sprężystości, której wartość jest obarczona zwykle dużym błędem,
  c) trójkątne sondy AFM są stosowane głównie z uwagi na ich trwałość,
  d) wprowadzając symbol S_{PSD} opisałabym, że jest on związany z wychyleniami sprężynki w kierunku normalnym, (co wynika ze wzoru 1.2),
  e) pomiar widma szumu termicznego pozwala na wyznaczenie częstotliwości rezonansowej drgań swobodnego końca sprężynki. Częstotliwość ta jest związana ze stałą sprężystości sprężynki. Trudno jest wyznaczyć c_{invOLS} na podstawie widma szumu termicznego.
  f) zdanie *„jeżeli pomiędzy ostrzem a próbką działają siły adhezji, ostrze ulega zagłębieniu bezpośrednio po zetknięciu się z próbką"* chyba było poprawiane kilkakrotnie. Sondy AFM są wykonane z azotku krzemu i są z zasady dużo sztywniejsze niż badania próbka biologiczna. Także, powierzchnia badanej próbki ulega ugięciu (indentacji) zawsze kiedy sonda AFM naciska na nią niezależnie czy są siły adhezji występują czy nie. Obecność sił adhezji ma wpływ na wielkość ugięcia materiału.
  g) stwierdzenie, że „w przypadku eksperymentów AFM wielkość kontrolowana w trakcie deformacji zależy od stałej sprężystości beleczki ostrza" jest również

zbyt żargonowe. Podczas eksperymentu AFM nie kontroluje się ani głębokości penetracji, ani obciążenia ani promienia kontaktu. W chwili obecnej nie ma takiego urządzenia na rynku.

- Tomografia sztywności jest podejściem stosowanym praktycznie przez jedną grupę badawczą. Jej istotą jest próba wizualizacji zmian elastyczności w całej objętości próbki w kierunku normalnym do badanej powierzchni. Obecnie jest szeroko dyskutowana stosowalność tej metody.
- Ciekawym aspektem pracy doktorskiej są zagadnienia związane z modelem Ogdena i Funga. Ich dotychczasowe zastosowanie jest związane z własnościami mechanicznymi tkanek mierzonych innymi technikami niż AFM, raczej makroskopowymi. W skali nanoskopowej ich stosowalność do opisu tkanek zawierających i pozbawionych włókien kolagenowych może być znacznie ograniczona.
- Czy metody podane przez autora pozwalają na odseparowanie wpływu naprężeń początkowych od własności elastycznych samej próbki ? Czy można zdefiniować jakieś kryterium pozwalające na taki odseparowanie ?

- Brakuje mi analizy porównawczej błędów wynikających z zastosowania opracowanych modeli teoretycznych z rzeczywistą analizą własności mechanicznych komórek uzyskiwaną do tej pory na podstawie tylko prostego modelu Hertz'a. W przypadku komórek biologicznych mogę spodziewać się, że rozrzut danych oraz błędy wynikające z niejednorodności próbki są dużo większe niż te wynikające ze zastosowania odpowiedniego modelu teoretycznego. Takie proste oszacowanie ubogaciłoby tę pracę i dodatkowo byłoby argumentem do wykorzystania wyników tej pracy w praktyce.

- Narzędzie analityczne jakim jest oprogramowanie AtomicJ jest wygodnym programem pozwalającym na zastosowanie wszystkich opracowanych przez autora modeli opisujących mechanikę kontaktu dla danego zbioru krzywych. Jedyną jego wadą jest fakt, że nie wszędzie pracuje (moim zdaniem powinien być tak skompilowany aby nie trzeba było re-instalować Javy i powinien zawierać wszystkie potrzebne biblioteki). Na pięć testowanych przeze mnie komputerów na jednym komputerze program nie zadziałał a na drugim nie mógł otworzyć danych, które na innych komputerach otwierały się bez problemu.

Jednym z problemów tematyki związanej z mikroskopią sił atomowych, jest terminologia pisana w języku polskim. Pan Paweł Hermanowicz opisał poprawnie językowo zagadnienia zawarte w pracy doktorskiej, jednakże kilka sformułowań jest moim zdaniem niezbyt dobrze dopasowanych do swoich angielskich odpowiedników:

- „*krzywa czy mapa siłowa*" używałabym terminu „krzywa siły" lub „krzywa siła-odległość" lub „mapa oddziaływania" (mimo iż to ja jestem autorką pojęcia „krzywa siłowa"). W mikroskopie sił atomowych sonda AFM wychyla się pod wpływem krótko lub długo-zasięgowych oddziaływań.
- „*sił oddziaływań pomiędzy próbką a ...*" - raczej napisałabym sił działających w polu kontaktu pomiędzy próbką a ...
- „*siły kontaktu z próbką*" to jest zbyt żargonowe sformułowanie. Siły prowadzące do wychylenia próbki to siły elektrostatyczne, van der Waalsa, hydrofobowe, steryczne, etc.
- zbyt żargonowe jest stwierdzenie „*kontakt typu JKR*". JKR to model teoretyczny opisujący zależność obciążenia od indentacji przy założeniu, że w polu kontaktu występują siły adhezji.
- zamiast terminu „*osiowosymetryczne ostrza*" użyłabym „*osiowosymetryczne indentery*" jako że termin ostrza jest raczej zarezerwowany dla obszaru AFM. Równania opisujące kształty osiowosymetrycznych indenterów są równaniami o stosowalności szerszej niż AFM.
- termin „*głębokość penetracji*" sugeruje, że sonda AFM wchodzi do wnętrza komórki przerywając integralność błony. Lepiej jest używać terminu „ugięcie materiału" lub „indentacji". Ten ostatni termin bezpośrednio jest związany ze sposobem pomiaru i jest powszechnie używany w klasycznej mechanice naprężeń.
- czasami autor stosuje terminy bez uprzedniej ich definicji -> równowagowy promień kontaktu.

Zauważone nieścisłości, które są nieuniknione w tak obszernej pracy, nikną wobec starannie przemyślanej struktury i jasnej szacie graficznej. Nie pomniejszają one mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej.

W podsumowaniu recenzji stwierdzam, że praca doktorska Pana mgr Pawła Hermanowicza stanowi oryginalne podejście teoretyczne do opisu mechaniki kontaktu sondy AFM z powierzchnią próbek biologicznych. Uzyskane wyniki są cenne i ważne dla ilościowego opisu zmian własności mechanicznych komórek zwierzęcych i roślinnych oraz tkanek. Dzięki tej wynikom uzyskanym w tej pracy oraz zaproponowanego narzędzia badawczego, jakim jest program AtomicJ, możliwe jest porównanie różnych modeli mechanicznych i wybór takiego, który najlepiej opisuje badaną próbkę.

Niezmierna aktualność i duże znaczenie praktyczne uzyskanych wyników podnosi wartość pracy. Biorąc pod uwagę wszystkie elementy recenzji stwierdzam, że praca spełnia wszelkie wymogi stawiane pracom doktorskim przez ustawę o stopniach i tytule naukowym oraz przez normy akademickie i wnoszę zarówno o dopuszczenie Pana mgr Pawła Hermanowicz do dalszych etapów przewodu doktorskiego jak i o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.

INSTYTUT FIZYKI JĄDROWEJ
im. Henryka Niewodniczańskiego
POLSKA AKADEMIA NAUK

Uzasadnienie wyróżnienia rozprawy doktorskiej Pana mgr Pawła Hermanowicza:

Oryginalność pracy polega na opracowaniu modeli teoretycznych opisujących mechanikę kontaktu sondy AFM z powierzchnią badanej próbki, pozwalających nie tylko na wyznaczenie wartości modułu Young'a ale także uwzględniających niektóre efekty ściśle związane z eksperymentami prowadzonymi za pomocą AFM. Jednym z nich jest wpływ obecności sztywnego podłoża co prowadzi do przeszacowania wartości modułu elastyczności. Efekty ten jest szczególnie znaczący dla cienkich próbek, których własności mechaniczne są mierzone za pomocą sferycznych sond AFM. Zagadnienie wpływu sztywnego podłoża zostało w pracy Pana Pawła Hermanowicza sprowadzone do równania Lebiediewa-Uflianda. Opisuje ono wpływ podłoża w oparciu o model Hertza przy zastosowaniu przybliżeń kształtu sondy AFM (głównie za pomocą paraboloidy i stożka). Drugim ważnym elementem pracy nierozważanym do tej pory w aspekcie pomiarów AFM jest zbadanie wpływu naprężeń początkowych na własności mechaniczne próbek wspartych na sztywnym podłożu. Ten aspekt posiada duże znaczenie do opisu własności mechanicznych włókien mięśniowych. Analiza ich własności elastycznych zakłada brak naprężeń co nie jest w pełni zgodne ze stanem rzeczywistym. Znajomość wpływu naprężeń początkowych jest niezbędna do prawidłowej interpretacji pomiarów, w tym wyznaczeniu wartości modułu Younga. Trzecim aspektem pracy doktorskiej zasługującym na uwagę jest wyprowadzenie zależności obciążenia od indentacji dla sprężystej ściany pozwalającej na opis zachowania się ściany komórkowej na którą działają naprężenia zewnętrzne. Nie bez znaczenia jest też napisanie autorskiego oprogramowania pozwalającego na zastosowanie różnych modeli teoretycznych opisujących mechanikę kontaktu sondy AFM z powierzchnią badanej próbki jakimi są komórki czy tkanki oraz wybór takiego, który w najlepszy sposób opisuje własności mechaniczne tak naprawdę niejednorodnym próbek biologicznych.

Kraków, 14.05.2018

Małgorzata Lekka

ul. Radzikowskiego 152, 31-342 Kraków, POLAND
www.ifj.edu.pl
switchboard: +48 12 662 8000