Data: Toruń, 15 maja, 2018
L. Dz.

Prof. dr hab. Wiesław Nowak
Zakład Biofizyki i Fizyki Medycznej
Instytut Fizyki
Uniwersytet M.Kopernika w Toruniu
87-100 Toruń, ul. Grudziądzka 5
(Wiesiek@fizyka.umk.pl)

**RECENZJA rozprawy doktorskiej**
**Mgr. Pawła Hermanowicza pt.**

**"Konstrukcja map właściwości mechanicznych próbek biologicznych w mikroskopii sił atomowych"**

Niewiele jest przykładów w nauce, kiedy prosty (i wydawałoby się oczywisty) pomysł przyrządu pomiarowego przyniósł tak wiele nowych wyników i rozumienia materii jak mikroskop sił atomowych (AFM). Binnig i Quate (PRL 1986) słusznie uzyskali za swój wynalazek Nagrodę Nobla, zaś nauki przyrodnicze cieszą się dzięki Nim z rozwoju bionanotechologii - w znacznej mierze opartej na technikach AFM. Ogromny rozwój sposobów obrazowania w nanoskali, w tym próbek biologicznych, przyniósł lepsze rozumienie wielu procesów i zjawisk. Jednym z żywiej dyskutowanych w literaturze wątków są próby wykorzystania AFM w nanomedycynie i badaniach biomedycznych, polegające na pomiarach elastyczności żywych komórek lub elementów struktur biologicznych. Wnioski uzyskiwane np. z oceny potencjału metastatycznego komórek rakowych w oparciu o pomiary ich właściwości mechanicznych mogą rzutować na strategię leczenia, zatem pomiary tego typu mają oczywiste wielkie znaczenia praktyczne. Niestety, mimo coraz lepszych rozwiązań konstrukcyjnych mikroskopów AFM, metodologia pomiarów, a w tym redukcja uzyskanych wyników, wciąż stwarza wiele problemów. W szczególności nie ma konsensusu jak efektywnie, wygodnie i poprawnie uwzględniać takie efekty jak mała grubość próbki, kształt ostrza AFM, obecność (lub nie) tarcia z podłożem czy występowanie wstępnych naprężeń w próbce. Mimo bogatej literatury w zakresie obliczania modułów Younga próbek polimerowych czy biologicznych z doświadczeń nanoindentacyjnych, wciąż nie ma ustalonej i powszechni przyjętej metodologii jak interpretować krzywe siłowe, czy jak uwzględniać efekty rozmiarowe. Przedstawiona mi do oceny praca doktorska mgr P. Hermanowicza znakomicie wpisuje się w tę niezwykle aktualną tematykę i na pewno swoją problematyką lokuje się w centrum zainteresowania wielu biofizyków.

Rozprawa, została napisana na Wydziale Biochemii, Biofizyki i Biotechnologii Uniwersytetu Jagiellońskiego w Krakowie, pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Haliny Gabryś. Autor przedstawił cele pracy w rozdziale 4. Można wyróżnić w nich 3 główne wątki:

1. Opracowanie metod (teoretycznych) wyznaczania modułu Younga z krzywych siłowych AFM zebranych na cienkich, liniowo-sprężystych próbkach wspartych na sztywnym podłożu.
2. Wyprowadzenie równań opisujących wpływ naprężeń wstępnie obecnych w próbce na sztywność kontaktu cienka próbka - sztywne podłoże.

3. Wyprowadzenie równań na zależność obciążenia od stopnia penetracji sprężystej ściany (np. komórki roślinnej).

Osobnym celem było przygotowanie programu komputerowego ( na licencji GNU) służącego do obróbki i analizy krzywych siłowych i tzw. map siłowych. Po wytrwałej lekturze pracy stwierdzam, że **postawione w rozprawie cele zostały w pełni osiągnięte.**

Nie jest łatwo zrecenzować rozprawę zawierającą 900 wzorów matematycznych! Mimo przejrzystej konstrukcji pracy, dość obszernych komentarzy, czyta się ją z dużym wysiłkiem, nawet dysponując aparatem matematycznym fizyka-teoretyka. Postaram się jednak zreferować i ocenić merytorycznie kolejne rozdziały i główne wątki oraz znaczenie tego doktoratu. Zastrzegam, że nie było moim celem sprawdzanie poprawności poszczególnych rachunków i dowodów. W dziedzinie tej niestety są możliwe błędy czy potknięcia {zob. błędy znalezione w tym roku przez V. Managuli i S. Roy'a [*„Asymptotical Correction to Bottom Substrate Effect Arising in AFM Indentation of Thin Samples and Adherent Cells Using Conical Tips"*, Experimental Mechanics, https://doi.org/10.1007/s11340-018-0373-8 w pracy Gavary i Chadwika na b. zbliżony temat dot. poprawek asymptotycznych uwzględniających rozmiar próbki [Gavara N, Chadwick RS (2012) *„Determination of the elastic moduli of thin samples and adherent cells using conical atomic force microscope tips"*. Nat Nanotechnol 7(11):733–736]}. Uważam, że jedynie wdrożenie chociaż części wyprowadzonych zależności teoretycznych do praktyki może zweryfikować ich poprawność i realną przydatność.

Praca doktorska P. Hermanowicza składa się z 10 rozdziałów zasadniczych, zawiera też Streszczenie, Podsumowanie, 12 dodatków matematycznych (A) i pewne listy współczynników w wyrażeniach Czebyszewa (B), łącznie 203 strony. Opatrzona jest spisem symboli i spisem literatury (ok. 200 pozycji). Pierwsze trzy rozdziały mają charakter monograficznego przeglądu tematyki i literatury. W rozdz. 1. podany jest zwięzły, ale kompletny opis techniki AFM, wraz z 4 metodami kalibracji dźwigni, opis rejestracji krzywych siłowych, wyznaczania punktu kontaktu i konstrukcji map siłowych. Ważną częścią tego rozdziału jest dyskusja problemów związanych z wyznaczaniem punktowego modułu Younga i wad tzw. tomografii sztywności. Czytelnik w kilku miejscach dowiaduje się jakie są problemy ze stosowanymi dotąd przybliżonymi opisami. Stanowi to cenne wprowadzenie w tematykę dalszych rozdziałów.

W rozdziale 2 autor opisuje podstawowe pojęcia fizyczne związane z pomiarami właściwości (a może własności ?) mechanicznych próbek. Zmierza do wprowadzania formalizmu matematycznego (tensorowej teorii sprężystości) opisującego deformacje próbki przez osiowosymetryczne ostrze. Rozdział definiuje rodzaje materiałów sprężystych, podane w nim są również związki nietypowych materiałów (np. hipersprężystych) z obiektami biologicznymi. Ważna w tym rozdziale jest autorska dyskusja problemu naprężeń początkowych próbki. Generalnie wywody mi się podobały, jednak np. nie dostrzegłem w dalszej części rozprawy wykorzystania informacji z sekcji 2.4., w szczególności równania Beltramiego (wzór 2.60). Zakładam, że zostało ono przytoczone dla kompletności, jako ważny element opisu sprężystości materiałów.

W rozdziale 3, poświęconym opisowi mechaniki kontaktu ostrza z próbką, „zaczynają się matematyczne schody". Autor wprowadza rodzaje kształtów rozważanych ostrzy AFM (cylindryczne, stożkowe, paraboloidalne, elipsoidalne - w tym sferyczne) oraz ostrza „tępe". Ostrza te opisuje odpowiednimi funkcjami $f(\rho)$. Definiuje warunki brzegowe dla różnych typów kontaktów z próbką (z tarciem, bezpoślizgowy). W całej pracy rozważane są dalej jedynie zagadnienia kontaktu beztarciowego. Ponieważ ostrza są osiowosymetryczne prowadzi rozważania w układzie współrzędnych walcowych.

Opis jest na ogół logiczny, ale momentami jednak zbyt zwięzły, pojawia się np. znienacka zdanie „Składowe sigma ... można wyznaczyć za pomocą metody funkcji odkształcenia Love'a" (str. 34) - bez podania źródła tej dobrej wiadomości ani wskazania, gdzie opis tej metody można znaleźć. Nie jest też z dla mnie jasne, kto jest autorem serii przekształceń prowadzących od pary równań całkowych typu Titchmarsha (3.2 i 3.63) do równania 3.82 (? Sneddon 1960?). W rozdziale 3 nie znalazłem definicji współczynnika Poissona ν. Pożyteczna i cenna w tym rozdziale jest sekcja 3.6.2, w której zebrano z literatury wyrażenia analityczne na obciążenie P i naprężenie $\sigma_z$ dla ostrzy o rozmaitych kształtach. Jest tam nawet pewna nowość – wzory dla tipu o kształcie tępego stożka o sferycznym wierzchołku.
W sekcjach 3.8 i 3.9 rozważane są szczególne przypadki próbek o skończonych rozmiarach na różnych podłożach (związana i niezwiązana próbka). Są to ważne i zaawansowane matematycznie rozważania, uwzględniające poszczególne warunki brzegowe eksperymentów. Opis poprowadzony jest jednak w ten sposób, że nie jest jasne kto jest autorem prezentowanych wywodów założeń i przekształceń (Lebiedev, Ulfiand, Pupyrev, PH?). Podobna uwaga odnosi się do sekcji 3.10 i 3.11, gdzie opisano przemieszczenia i naprężenia dla kontaktu z cienką próbką (?PH?).

Nowe wyniki analityczne dla opisu kontaktu ostrza z cienką próbką zawiera rozdział 5 (15 stron). Główne rozważania prowadzone są przy wykorzystaniu wprowadzonego w oparciu o wcześniejsze publikacje równanie Lebiedewa-Uflianda (LU). Badany jest potencjalny wpływ obecności/nieobecności sztywnego podłoża na promień kontaktu ostrza z próbką i wynikające stąd możliwe poprawki na oszacowanie elastyczności (modułu Younga) badanego materiału. Większość sekcji 5.1 autor poświęca dowodzeniu własności (dodatniości) pewnych funkcji występujących w równaniu LU. Są to żmudne, a momentami zawiłe rozważania. Nie znalazłem w tym opisie komentarza dlaczego to jest ważne i co z tego dowodzenia wynika. Pożyteczne informacje płyną z analizy ciekawy wykresów: Ryc. 5.1. i Ryc. 5.2. Możemy z nich zobaczyć jak silnie (nawet 30% wzrost) wpływa głębokość penetracji na równowagowy promień kontaktu dla sond „koloidowych" (o promieniu krzywizny 2 mikrometry). Autor w tym rozdziale i późniejszych rozważa materiały o różnych modelowych współczynnikach Posissona ν (np. ν=0.5), trochę szkoda, że nigdzie w rozprawie nie znalazłem przykładów konkretnych materiałów biologicznych odpowiadających poszczególnym rozważanym parametrom ν.

W rozdziale 6 zawarte są oryginalne wyniki rozwiązań równania Lebiediewa-Uflianda. Jest to (dla wszystkich rozważanych modeli) równanie całkowe Fredholma drugiego rodzaju. Mgr P. Hermanowicz rozwiązał je numerycznie stosując zaawansowane techniki numeryczne i program „Mathematica". Celem rozwiązywania było poszukiwanie wyrażeń na równowagowy promień kontaktu dla różnych głębokościach penetracji w eksperymencie AFM. Rozdział ten dowodzi jak wielką "erudycją" matematyczną i programistyczną dysponuje doktorant. Na przykład, zwykłą techniką jest przybliżanie poszukiwanych funkcji rozwinięciem na układ zupełny funkcji. Można wybierać różne układy, ale nie wszystkie są „optymalne". Bardzo podobał mi się przykład pokazany na Ryc. 6.1 gdzie widzimy, że zastosowanie do przybliżania funkcji Ω często używanych wielomianów Hermite'a daje (w niskich rzędach rozwinięcia – tj. do 15) błędy względne wiele rzędów wielkości większe niż zastosowane przez doktoranta (a dość egzotyczne) funkcje Christowa (opisane w A.11), dające wykładniczy spadek błędu. Ciekawą propozycją jest stosowanie metody kolokacji (podanej w literaturze ok. 2002 roku) do rozwiązywania równania LU. Metoda ta jest szybsza numerycznie, zwłaszcza jak się dobrze dobierze siatki całkowania do danego problemu. Autor przeprowadził w tym rozdziale obszerną analizę błędów wynikających z zastosowanych różnych przybliżeń i metod numerycznych, jednak przedstawione wykresy świadczą o tym, że błędy względnie szybko spadają poniżej $10^{-3}$. Powstaje zatem pytanie, czy wysiłek zmierzający do jak najlepszego matematycznie (czy raczej numerycznie) rozwiązania równań

metody ma sens: poprawianie teorii na tak zaawansowanym poziomie niewiele wnosi, zważywszy na inne liczne źródła szumów i niepewność w typowym eksperymencie AFM badającym elastyczność próbki biologicznej. Byłbym ciekaw opinii doktoranta w tej sprawie (np. na obronie) ponieważ w rozprawie ta kwestia nie jest dyskutowana.

Tytuł kolejnego rozdziału (7) jest wg mnie „mało informatywny" *„Przybliżone rozwiązania dla kontaktu ostrza z próbką"* – nie bardzo wiadomo, co w tym rozdziale będzie rozwiązywane. Jak już się przeczyta rozdział, to można się dowiedzieć, że m.in. wyznaczane są wyrażenia na promień kontaktu „a" oraz obciążenie P (w funkcji indentacji) dla różnych osiowosymetrycznych ostrzy i dla różnych próbek (cienkich, umocowanych i nie umocowanych do podłoża). Wyznaczany też jest pierwszy wyraz $a_0$ wyrażenia na promień kontaktu, ponieważ znajomość $a_0$ pozwala potem obliczyć moduły Younga E próbek badanych metodą AFM. Jawne wyrażenia na parametr $a_0$ autor uzyskał metodami zaburzeniowymi. Jawne wyrażenia na promień kontaktu pozwalają znakomicie skrócić czas analizy danych eksperymentalnych. Jak widać z obszernej analizy przeprowadzonej w omawianym rozdziale, są one różne dla różnych kształtów ostrzy. Przedstawione złożone wzory nie pozwalają jednak zorientować się jakie ostrze (kształt) najlepiej nadawałoby się (z punktu widzenia dokładności opisu nanomechaniki) do eksperymentów z próbkami biologicznymi. Inna uwaga jaka nasunęła mi się po lekturze tego obszernego rozdziału (35 stron), to kwestia, czy wszędzie zakładano brak sił adhezji pomiędzy ostrzem a próbką, czy też obecność takich sił nie zmieniłaby wyników analitycznych/numerycznych? Autor na wielu wykresach podaje wyniki uzyskane ze wzorów (7.18) i (7.19) z pracy (Gavara Chedwick 2012); ciekawe czy wykresy te są nadal prawdziwe, zważywszy na pewne niedostatki tej publikacji zasygnalizowane niedawno (https://doi.org/10.1007/s11340-018-0373-8)? Wyrażenia asymptotyczne wyprowadzone w rozprawie są obarczone faktycznie znacznie mniejszym błędem niż podawane wcześniej (np. maksymalny błąd względny na poziomie 0.2 %, str. 131).

Rozdział 8 otwiera nowe pole eksploracji: poszukiwanie poprawnego opisu procesu indentacji dla cienkiej próbki, ale takiej, w której występują naprężenia początkowe. Jest to bez wątpienia b. trudny problem, jednak ważny, ponieważ w komórkach (i wielu innych obiektach biologicznych) naprężenia występują i często są zmienne. Typowe modele z naprężeniami to materiały „typu Funga" (ich sztywność wzrasta wraz z odkształceniem, np. tkanka łączna) i „typu Ogdena" (opis gumy, opis tkanki mózgowej) były rozważane w tym rozdziale. Konieczne było wprowadzenie pojęcia gęstości energii sprężystej. Rozdział zawiera szereg zawiłych wyprowadzeń na równowagowy promień kontaktu dla tych nowych, bardziej realistycznych przypadków.

Rozdział 9 był dla mnie szczególnie ciekawy bowiem sam zajmowałem się analizą nanomechaniki nanorurek węglowych podpartych na końcach. Tutaj analizowany jest ogólny przypadek podpartej belki poddanej nanoindentacji (kontakt ze ścianą dowolnej grubości). Może to być np. ściana komórki pozbawionej cytoplazmy. Model ten wymaga swoistych warunków brzegowych, jest potrzebny, ale trudny w analizie. Ważnym wynikiem wykazanym w tym rozdziale jest spostrzeżenie, iż promień kontaktu ze ścianą jest w rzeczywistości znacznie mniejszy niż promień wyznaczony dla założenia o nieskończonej grubości próbki. W rozdziale rozwiązano zagadnienie brzegowe dla cylindrycznej próbki nie naprężonej (9.1.1) i poddanej naprężeniom (9.2.1). Podano nowe wzory na obciążenie ściany deformowanej bryłą potęgową (9.69) i (9.150) oraz (9.162). Komentarz autorski w tym przypadku też jest dość enigmatyczny. Nie mam np. jasności, które z licznych wyprowadzeń z rozdziału 9 są dziełem doktoranta, a które zostały przytoczone z literatury (np. od Sneddona czy Trantera). Niektóre wyniki są pozostawione niemal bez komentarza „doświadczalnego", np. na str. 160 mamy ciekawy wzór (9.69) na P(a) dla próbki skończonej, autor zauważa skromnie, iż różni się on jedynie obecnością pewnych dwóch czynników od znanego wzoru dla próbek nieskończenie grubych, ale nie próbuje już przedyskutować

jakie wartości „w realu" mogą przyjmować te czynniki i czy zaburzy to mocno dane, jeśli w analizie pomiarów założymy próbkę nieskończenie grubą (a takich przecież nie ma..).

Rozdział 10 zawiera opis największego osiągnięcia praktycznego doktoranta – programu Atomic J. Program napisany w środowisku JAVA jest zaawansowany i obszerny, składa się z ok. 250 tys. linii kodu. Zaopatrzony jest w starannie opracowany podręcznik użytkownika. Mgr P. Hermanowicz zaimplementował w nim szereg modeli beztarciowego kontaktu z nieskończenie grubą liniowo-sprężystą próbką, ale też z modelami kontaktu bez adhezji dla próbek cienkich, w tym rozwiniętych w recenzowanej rozprawie. Jak wynika z opisu w programie są nawet jeszcze inne zaawansowane modele kontaktu nie rozważane w doktoracie. Użytkownik ma do wyboru wiele modeli kształtu ostrza AFM. Analiza krzywych siłowych – bardzo rozbudowana – jest ułatwiona dzięki zastosowaniu ładnego i szybkiego interfesju graficznego. W oparciu o wczytane dane z doświadczenia AFM (wspierane są typowe i niektóre rzadkie formaty komercyjnych przyrządów) Atomic J oblicza moduł Younga, współrzędne punktu kontaktu, obciążenie w momencie zerwania kontaktu i energii adhezji. Krzywe siłowe mogą być analizowane na wiele typowych i zadanych przez użytkownika sposobów. Można obrabiać mapy właściwości mechanicznych próbki, filtrować i odszumiać dane. Można definiować wybrane rejony (ROI) do analizy. Wiele czynności obróbki danych można wykonać „intuicyjnie" przy pomocy myszki. Cennym narzędziem jest możliwość generowania profili właściwości wzdłuż zadanych ścieżek w próbce. Część obliczeń trwa długo, zatem dla poprawy wydajności autor zaimplementował (gdzie to potrzebne i możliwe) przetwarzanie równoległe (na wielu rdzeniach). Program używany jest w naszym Zakładzie Biofizyki UMK od blisko 2 lat, przydaje się, i opinie o nim są bardzo dobre. Jest bezpłatny, zaś dwaj (zbliżeni) komercyjni konkurenci pobierają solidne opłaty licencyjne co roku. Uważam, że takie narzędzie badawcze było potrzebne i jest to wielki sukces doktoranta i zespołu krakowskiego.

Praca doktorska napisana jest jasnym, poprawnym językiem. Jest zredagowana bardzo starannie, znalazłem zaledwie kilka literówek. Jakość rysunków jest dobra. Nie było moim celem sprawdzanie pełnej poprawności przytaczanych i wyprowadzanych wzorów. Głównym moim problemem w lekturze rozprawy (jako recenzenta) były mocno splecione treści o charakterze „referatowym" i oryginalne wywody doktoranta. W pracy w zasadzie nie ma „odkryć" czy wyników o charakterze biologicznym, jednak jak wspomniałem, jest za to w niej zawarta dogłębna analiza i rozwój cennej doświadczalnej metody biofizycznej. Uwagi krytyczne nie umniejszają mojej wysokiej oceny pracy. Uważam, że powinna być ona opublikowana jako mała monografia w języku angielskim. Nawet w obecnej formie stanowi cenne źródło dla osób zajmujących się badaniami AFM czy to w fizyce, czy chemii czy biologii.

**KONKLUZJA**

Uważam, że mgr Paweł Hermanowicz realizując swoją rozprawę doktorską wykonał szereg obliczeń analitycznych i numerycznych oraz analiz modeli fizycznych związanych z ważną w biofizyce metodą AFM. Usystematyzował i poprawił formalny opis procesu uzyskiwania krzywych i map siłowych dla cienkich próbek, w tym biologicznych. Opracował unikatowy i sprawnie działający program do analizy wyników pomiarów AFM.

Stwierdzam, że przedłożona mi do oceny rozprawa doktorska mgr. Pawła Hermanowicza pt. "Konstrukcja map właściwości mechanicznych próbek biologicznych w mikroskopii sił atomowych" stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego. Wykazuje wiedzę doktoranta w naukach biologicznych, w zakresie dyscypliny biofizyka, a zwłaszcza w jej aspektach teoretycznych i

matematycznych. Ponadto rozprawa dobitnie wykazuje umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, tj. spełnia wymagania ustawowe [Ustawa z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki ze zmianami późniejszymi (Dz. U. Nr 65, poz. 595, ze zm. w Dz. U. z 2005 r. Nr 164, poz. 1365 oraz w Dz. U. z 2011 r. Nr 84, poz. 455] oraz zwyczajowe stawiane rozprawom doktorskim. Wobec powyższego wnoszę o dopuszczenie Pana magistra Pawła Hermanowskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Ze względu na ogromny, wręcz benedyktyński, nakład systematycznej pracy analityczno-badawczej związanej z doktoratem, monograficzny charakter rozprawy, duże znaczenie części wyników dla środowisk badających elastyczność próbek biologicznych i polimerów, opublikowanie artykułu w światowym czasopiśmie specjalistycznym „Rev. Sci. Inst.", a przede wszystkim za opracowanie i udostępnienie bardzo użytecznego i potrzebnego programu AtomicJ, wnioskuję o przedstawienie rozprawy do wyróżnienia, zgodnie z panującymi na Wydziale zasadami.

W. Nowak

Wiesław Nowak, prof. zw.