



Warszawa, 17 grudnia 2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Katarzyny Życieńskiej
pt. „Badanie własności fizycznych i modelowanie pęcherzyków
zwnątrzkomórkowych w nano-skali z użyciem mikroskopii sił
atomowych oraz analizy śledzenia nanocząstek”**

Praca doktorska mgr Katarzyny Życieńskiej zatytułowana „Badanie własności fizycznych i modelowanie pęcherzyków zwnątrzkomórkowych w nano-skali z użyciem mikroskopii sił atomowych oraz analizy śledzenia nanocząstek” została wykonana pod opieką naukową dr hab. Macieja Kamińskiego, prof. UW oraz dr Józefa Gintera, w Zakładzie Fizyki Biomedycznej, Instytutu Fizyki Doświadczalnej, na Wydziale Fizyki Uniwersytetu Warszawskiego.

I. Tematyka rozprawy i jej aktualność

Tematyka rozprawy dotyczy eksperymentalnej i teoretycznej charakteryzacji pęcherzyków zwnątrzkomórkowych (EVs) w nanoskali, ze szczególnym uwzględnieniem ich właściwości geometrycznych, adhezyjnych i mechanicznych. Praca koncentruje się na opracowaniu, walidacji i zastosowaniu metod mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz analizy śledzenia nanocząstek (NTA) do ilościowego badania EVs pochodzenia komórkowego.

Jest to obszar niezwykle dynamicznie rozwijający się, co potwierdza gwałtowny wzrost liczby publikacji z ostatnich lat w dziedzinach biofizyki, nanomedycyny i technologii pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Aktualność tematyki wynika z faktu, że EVs są uznawane za jedno z najbardziej obiecujących biomarkerów i nośników terapeutycznych. Ich rola w diagnostyce nowotworów, medycynie spersonalizowanej, immunologii czy terapii RNA jest szeroko dyskutowana w najnowszej literaturze. Jednocześnie wciąż istnieje pilna potrzeba standaryzacji i udoskonalenia metod charakteryzacji fizycznej EVs, zwłaszcza w zakresie pomiaru ich wielkości, kształtu, deformowalności oraz dynamiki oddziaływania z podłożem. Rozprawa wpisuje się zatem w jeden z centralnych problemów współczesnej nauki o EVs: zrozumienie ich właściwości fizycznych na poziomie pojedynczych pęcherzyków.

Autorka rozprawy wniosła istotny wkład do tej dziedziny, opracowując procedurę obrazowania EVs w cieczy na AFM, obejmującą m.in. uzyskanie stabilnego, pozbawionego zanieczyszczeń podłoża mikowego o dodatnim ładunku powierzchniowym. Jest to zagadnienie o dużym znaczeniu praktycznym, ponieważ wiarygodność pomiarów AFM silnie zależy od jakości i powtarzalności immobilizacji badanych pęcherzyków. W rozprawie przeanalizowano również zależność kąta przylegania od średnicy EVs, wykazując, że mniejsze pęcherzyki charakteryzują się większym kątem kontaktu, co znajduje odzwierciedlenie we wzroście współczynnika wysokość/promień krzywizny (H/R_c).

Jednym z najważniejszych osiągnięć jest wprowadzenie współczynnika skalowania AFM–NTA, który opisuje relację między średnicą geometryczną a hydrodynamiczną danej populacji EVs. Jest to propozycja o dużej wartości praktycznej i potencjalnym znaczeniu dla standaryzacji pomiarów wielkości pęcherzyków, problemie szeroko dyskutowanym w środowisku naukowym.

Dodatkowo autorka zaproponowała szybką procedurę estymacji modułu zginania błony na podstawie geometrii pęcherzyka i ograniczonej liczby krzywych spektroskopii sił. Tego typu uproszczone podejście do mechanicznej charakterystyki EVs ma duży potencjał aplikacyjny, biorąc pod uwagę rosnące zainteresowanie właściwościami mechaniki błony w kontekście różnic biologicznych, stanów chorobowych i zastosowań terapeutycznych.

Podsumowując, tematyka rozprawy jest w pełni aktualna, zgodna z globalnymi trendami badań nad EVs i stanowi znaczący wkład w rozwój metodologii, modelowania oraz interpretacji danych biofizycznych. Opracowane w niej rozwiązania mają znaczenie nie

tylko dla podstawowego zrozumienia własności pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, ale również dla ich przyszłych zastosowań diagnostycznych i terapeutycznych.

II. Cel i struktura pracy

Celem rozprawy było zbadanie właściwości fizycznych pęcherzyków lipidowych w nanoskali, ze szczególnym uwzględnieniem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EVs), poprzez połączenie badań eksperymentalnych i modelowania teoretycznego. W pracy dążono do opracowania i walidacji metodologii obrazowania i analizy pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz do porównania uzyskanych wyników z parametrami hydrodynamicznymi mierzonymi metodą analizy śledzenia nanocząstek (NTA).

Realizacja tego celu miała umożliwić lepsze zrozumienie właściwości fizycznych EVs, co jest istotne zarówno dla ich wykorzystania w procedurach diagnostycznych, jak i dla ich potencjalnej roli jako nośników leków.

W ramach badań analizowano EVs pochodzące z hodowanych w Zakładzie Fizyki Biomedycznej UW komórek nowotworu prostaty PC3 oraz sztucznie przygotowane pęcherzyki lipidowe.

Wyniki eksperymentów AFM i NTA zestawiono z obliczeniami uzyskanymi z dwóch modeli teoretycznych:

(1) modelem opisującym kształt i sztywność pęcherzyka osadzonego na powierzchni miki w oparciu o teorię Canhama–Helfricha oraz (2) modelem opisującym proces adsorpcji pęcherzyków na podłożu, opartym na teorii ruchów Browna w kropli cieczy.

Rozprawa ma przejrzystą strukturę, obejmującą zarówno wprowadzenie teoretyczne, szczegółowy opis metod, jak i cztery części prezentujące wyniki eksperymentalne oraz ich interpretację. Praca składa się z sześciu głównych części, a części wynikowe (III–VI) zakończone są odrębną dyskusją odnoszącą uzyskane wyniki do literatury i modeli teoretycznych.

Część I – Wstęp (rozdz. 1–3)

Przedstawia kontekst naukowy badań nad pęcherzykami zewnątrzkomórkowymi i liposomami, omawia podstawy biofizyki membran oraz szczegółowo wprowadza dwie kluczowe metody analityczne wykorzystane w pracy: mikroskopię sił atomowych (AFM) i analizę śledzenia nanocząstek (NTA).

Część II – Metodologia eksperymentalna (rozdz. 4–6)

Obejmuje opis wszystkich wykorzystywanych próbek, a także bardzo szczegółowy opis przygotowania podłoża i prowadzenia pomiarów AFM, łącznie z omówieniem

artefaktów i parametrów pracy mikroskopu. Osobny rozdział przedstawia metodologię analiz NTA.

W części poświęconej hodowli komórkowej oraz izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych doktorantka przedstawia szczegółowy opis zastosowanej metodologii, obejmujący zarówno warunki hodowli linii komórkowej, jak i kolejne etapy izolacji EVs. Na podkreślenie zasługuje fakt, że autorka jasno wskazuje, kto w zespole odpowiadał za poszczególne etapy prac eksperymentalnych, w tym hodowlę komórek i izolację pęcherzyków. Takie podejście jest niezwykle istotne w pracach interdyscyplinarnych, gdzie rzetelne rozdzielenie kompetencji i odpowiedzialności zwiększa przejrzystość badań oraz ich powtarzalność.

Zwracam jednak uwagę, że w opisie metodologicznym nie doprecyzowano jednoznacznie, czy wszystkie eksperymenty AFM i NTA były wykonywane na świeżo wyizolowanych pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, czy też na próbkach wcześniej zamrożonych i następnie rozmrażanych. Kwestia ta ma istotne znaczenie, ponieważ liczne doniesienia literaturowe oraz wytyczne Międzynarodowego Towarzystwa Pęcherzyków Zewnątrzkomórkowych (Thery et al., 2018) wskazują, że cykle zamrażania i rozmrażania mogą wpływać na rozkłady rozmiarów EV, sprzyjać ich agregacji oraz modyfikować parametry geometryczne i mechaniczne. Uzupełnienie tej informacji pozwoliłoby na pełniejszą ocenę wpływu przygotowania próbek na uzyskane wyniki oraz ułatwiłoby ich porównanie z danymi literaturowymi.

Uprzejmie proszę doktorantkę o doprecyzowanie, czy wszystkie pomiary AFM i NTA były wykonywane na pęcherzykach zewnątrzkomórkowych poddanych cyklowi zamrażania i rozmrażania, czy też obejmowały również próby wykonywane na świeżo wyizolowanych EV. Proszę także o wskazanie, czy porównywano wyniki uzyskane dla pęcherzyków świeżych i przechowywanych oraz w jaki sposób potencjalny wpływ procedur zamrażania i rozmrażania był uwzględniany w interpretacji przedstawionych wyników.

W badaniach AFM deklarowana siła obrazowania rzędu 600 pN (do 1 nN) jest relatywnie wysoka jak na tak podatne mechanicznie obiekty. W literaturze (np. Vorselen et al., 2020) konsekwentnie podkreśla się konieczność stosowania możliwie niskich sił oraz dokumentowania ich wpływu na parametry geometryczne pęcherzyków, takie jak wysokość (H) i promień krzywizny (Rc). W rozprawie brak jest systematycznej analizy zależności H i Rc od ustawionej siły, co utrudnia jednoznaczne określenie, w jakim stopniu stosowane warunki mogły prowadzić do częściowego spłaszczenia obrazowanych struktur.

Uprzejmie proszę doktorantkę o ustosunkowanie się podczas obrony do powyższej uwagi oraz o wyjaśnienie, w jaki sposób można eksperymentalnie wyznaczyć zakres sił, w

którym geometria pęcherzyków pozostaje nienaruszona, a uzyskiwane obrazy odzwierciedlają ich rzeczywisty kształt.

Wszystkie cztery kolejne części rozprawy zawierają prezentację danych eksperymentalnych połączoną z analizą numeryczną oraz dyskusją.

Część III – Parametry geometryczne pęcherzyków (rozdz. 7–10)

Autorka szczegółowo przedstawia sposób wyznaczania wysokości H , promienia krzywizny R_c , szerokości połówkowej (FWHM) oraz średnicy geometrycznej pęcherzyka swobodnego w cieczy. Dokonano selekcji jakościowej obiektów oraz przeprowadzono analizę porównawczą trzech typów pęcherzyków. Część ta kończy się dyskusją dotyczącą otrzymanych rozkładów i ich interpretacji.

Część IV – Model przylegania do podłoża (rozdz. 11–12)

Skupia się na analizie kąta przylegania α oraz na modelu opartym na teorii Canhama–Helfricha. Model dopasowano do wyników eksperymentalnych, co umożliwiło interpretację zależności H/R_c i α jako funkcji średnicy pęcherzyków. W części tej znajduje się szczegółowa dyskusja porównująca dane do przewidywań teoretycznych.

Część V – Badanie sztywności i modułu zginania (rozdz. 13–17)

Zawiera eksperymentalne wyniki spektroskopii sił i analizę sztywności pęcherzyków, a także model naciskania pęcherzyka przez sondę AFM. Autorka przedstawia metodę wyznaczania modułu zginania i porównuje ją do wartości znanych z literatury. Część ta również zakończona jest dyskusją wyników.

Część VI – Uwzględnienie ruchów Browna i analiza porównawcza AFM–NTA (rozdz. 18–19)

Autorka bada zależność między średnicami geometrycznymi (AFM) i hydrodynamicznymi (NTA), stosując dopasowanie rozkładów log-normalnych. Szczegółowo analizuje zmiany średnich średnic w czasie od naniesienia próbki oraz przeprowadza symulacje ruchów Browna wyjaśniające obserwowane zjawiska. Część kończy dyskusja integrująca wyniki eksperymentu i symulacji.

Rozprawę zamyka syntetyczne podsumowanie najważniejszych osiągnięć, w którym doktorantka wymienia pięć kluczowych rezultatów swojej pracy:

1. Opracowanie optymalnej metodologii obrazowania pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na AFM, w tym procedury szybkiego i powtarzalnego przygotowania podłoża.

2. Udokumentowanie i wyjaśnienie wzrostu średnicy geometrycznej EVs w czasie, poparte analizą eksperymentalną i modelowaniem.
3. Wprowadzenie rozkładu log-normalnego do opisu średnic AFM i NTA oraz zaproponowanie współczynnika skalowania AFM–NTA jako cechy populacji pęcherzyków.
4. Zaobserwowanie i modelowe potwierdzenie wzrostu kąta przylegania dla małych EVs i liposomów.
5. Opracowanie szybkiej procedury estymacji modułu zginania przy wykorzystaniu modelowania oraz ograniczonej liczby krzywych siła–odległość.

III. Część wynikowa i analiza danych

Część wynikowa rozprawy (części III–VI) jest obszerna i bogata w dane. Doktorantka przeprowadziła kompletne analizy geometryczne, adhezyjne i mechaniczne pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, łącząc dane eksperymentalne AFM i NTA z modelowaniem teoretycznym.

Wyniki obrazowania AFM zostały zinterpretowane zarówno w kategoriach podstawowych parametrów geometrycznych jak i dodatkowych wielkości opisujących interakcję z podłożem, takich jak kąt przylegania czy stosunek wysokości do promienia krzywizny. Dane geometryczne zostały następnie zestawione z rozkładami hydrodynamicznymi uzyskanymi metodą NTA, co pozwoliło na zaproponowanie nowej, ilościowej relacji między tymi dwoma metodami w postaci współczynnika skalowania AFM–NTA. Jest to oryginalny i interesujący wynik, rzadko spotykany w dotychczasowych pracach nad EVs.

W uzasadnieniu podjęcia badań nad właściwościami mechanicznymi pęcherzyków zewnątrzkomórkowych doktorantka wskazuje, że analiza ta EV ma istotne znaczenie zarówno z punktu widzenia badań podstawowych, jak i potencjalnych zastosowań biomedycznych, w szczególności w kontekście wykorzystania pęcherzyków jako nośników leków. Jako istotny kontekst tych rozważań autorka wskazała pracę Guo et al., w której na modelowym układzie pęcherzyków wykazano, że elastyczność nanostruktur w istotny sposób wpływa na ich wychwyt komórkowy oraz dystrybucję *in vivo*.

Należy jednak zaznaczyć, że w cytowanej pracy analizowany był układ o uproszczonej, syntetycznej powierzchni lipidowej, pozbawionej białek i złożonych struktur glikokoniuugatowych charakterystycznych dla naturalnych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych. W związku z tym wyniki Guo et al. należy traktować przede wszystkim jako dowód potwierdzający znaczenie właściwości mechanicznych

nanostruktur, przy jednoczesnej konieczności ostrożnego przenoszenia tych wniosków na układy EV o złożonej biologicznej architekturze powierzchni.

W przypadku naturalnych EV o losach biologicznych, takich jak adhezja do błony komórkowej, wybór drogi internalizacji czy swoistość oddziaływań międzykomórkowych, w decydującym stopniu współuczestniczą białka powierzchniowe oraz profil glikozylacji. Elementy te modulują rozpoznanie receptorowe, oddziaływania elektrostatyczne oraz mechanizmy endocytotyczne, co oznacza, że właściwości mechaniczne pęcherzyków nie mogą być interpretowane w oderwaniu od ich kontekstu molekularnego i składu powierzchniowego.

W literaturze dotyczącej mechaniki komórek podkreśla się istotną rolę glikokaliksu jako warstwy typu szczotki polimerowej, której właściwości mechaniczne opisywane są m.in. w ramach dwuwarstwowego modelu zaproponowanego przez Sokołowa. W podejściu tym odpowiedź mechaniczna obiektu biologicznego na indentację AFM rozdzielana jest na dwa wkłady: początkowy, wynikający z kompresji powierzchniowej warstwy glikokoniugatów (opisywany modelem szczotki polimerowej), oraz głębszy, odpowiadający sprężystej deformacji właściwej struktury biologicznej.

W świetle przedstawionych w rozprawie wyników oraz ograniczeń zaproponowanego modelu mechanicznego pęcherzyków proszę doktorantkę o odniesienie się do pytania, w jaki sposób możliwe byłoby połączenie opisu mechaniki pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z ich składem powierzchniowym, w szczególności obecnością białek i glikokonjugatów. Czy i w jakim zakresie adaptacja podejścia zaproponowanego przez Sokołowa, polegająca na analizie krzywych siła–odległość w dwóch reżimach indentacji oraz na rozdzieleniu wkładu powierzchniowej warstwy od odpowiedzi samej błony lipidowej, mogłaby pomóc w interpretacji uzyskanych krzywych spektroskopii sił AFM i w bardziej jednoznacznym wyznaczaniu parametrów mechanicznych EV?

IV. Ocena dorobku naukowego doktorantki

Dorobek naukowy doktorantki jest spójny tematycznie i ściśle powiązany z tematyką rozprawy doktorskiej. Obejmuje on publikacje w recenzowanych czasopismach międzynarodowych, aktywny udział w konferencjach naukowych, realizację projektów badawczych oraz pozyskiwanie finansowania w drodze konkursowej.

Najważniejszym elementem dorobku jest praca opublikowana w czasopiśmie *International Journal of Molecular Sciences* (Życieńska et al., 2022), w której doktorantka była inicjatorką koncepcji badawczej i odpowiadała za przeprowadzenie eksperymentów AFM, opracowanie algorytmów analizy danych, analizę obrazów, przygotowanie wizualizacji oraz współtworzenie i redakcję tekstu. Praca ta stanowi istotny element merytoryczny rozprawy doktorskiej i dokumentuje samodzielność naukową doktorantki

na zaawansowanym etapie badań. Warto zaznaczyć, że choć czasopismo to wydawane jest przez wydawnictwo MDPI, posiada ono wieloletnią renomę oraz ugruntowaną pozycję w obszarze badań z zakresu biologii molekularnej i biofizyki.

Pozostałe publikacje, w których doktorantka jest współautorką, potwierdzają jej aktywność badawczą w projektach interdyscyplinarnych. W pracy Pszczółkowska et al. (2022) doktorantka brała udział w eksperymentach związanych z izolacją EV i analizą NTA oraz współuczestniczyła w redakcji tekstu. Z kolei publikacja Akuwudike et al. (2023) dokumentuje jej kompetencje w zakresie analizy obrazów mikroskopii elektronowej oraz interpretacji danych eksperymentalnych z pogranicza biofizyki i biologii molekularnej.

Doktorantka wykazuje również wysoką aktywność konferencyjną, regularnie prezentując wyniki swoich badań w formie referatów ustnych i posterów na konferencjach krajowych i międzynarodowych, w tym wystąpieniach bezpośrednio związanych z tematyką EVs, AFM i NTA. Na szczególne podkreślenie zasługuje uzyskanie nagród konferencyjnych za prezentacje ustne i plakaty, co świadczy o wysokiej jakości przedstawianych wyników oraz ich pozytywnym odbiorze przez środowisko naukowe.

Istotnym elementem dorobku doktorantki jest także aktywność projektowa i grantowa. Doktorantka była kierownikiem dwóch grantów IDUB Uniwersytetu Warszawskiego, w tym projektu poświęconego badaniom pęcherzyków zewnątrzkomórkowych.

Na uwagę zasługuje również udział doktorantki w projektach aplikacyjnych i interdyscyplinarnych, obejmujących m.in. współpracę z Wielkopolskim Centrum Onkologii nad algorytmami wspierającymi planowanie radioterapii, projekty z zakresu analizy obrazów medycznych z wykorzystaniem sieci neuronowych oraz rozwój dydaktycznego modelu tomografu komputerowego. Aktywności te potwierdzają szerokie kompetencje doktorantki w zakresie programowania, analizy danych oraz łączenia metod fizycznych, informatycznych i biomedycznych.

V. Wnioski końcowe

Od strony formalnej rozprawa spełnia wymogi stawiane dysertacjom doktorskim. W rozprawie, w szczególności w części metodologicznej, język opisu procedur eksperymentalnych nie zawsze spełnia standardy stylu naukowego, które są oczekiwane w pracy doktorskiej. W kilku miejscach pojawiają się sformułowania o charakterze potocznym i opisowym, typowe raczej dla narracji dydaktycznej niż formalnego opisu metod badawczych.

Na tym tle szczególnie zwraca uwagę podrozdział 5.2.1 „Refleksje osobiste”, w którym zastosowany został wyraźnie odmienny styl narracyjny. Przytoczony fragment ma charakter opisowy i anegdotyczny, posługuje się językiem potocznym oraz porównaniami o charakterze publicystycznym (np. odwołania do „pracy

zegarmistrzowskiej”, subiektywne komentarze dotyczące trudności prac eksperymentalnych), które nie są typowe dla tekstów naukowych ani rozpraw doktorskich. Tego rodzaju narracja, choć może być interesująca z perspektywy dydaktycznej lub popularyzatorskiej, nie spełnia standardów języka naukowego, który powinien być bezosobowy, precyzyjny i pozbawiony elementów subiektywnych.

Z punktu widzenia struktury i spójności rozprawy zasadne byłoby przeniesienie tego podrozdziału do materiałów uzupełniających (suplementu lub aneksu).

Podkreślam, że wskazana uwaga ma charakter wyłącznie redakcyjny i formalny i w żaden sposób nie umniejsza wartości merytorycznej przeprowadzonych badań ani kompetencji eksperymentalnych doktorantki, które zostały udokumentowane w sposób rzetelny i przekonujący.

Przedstawiona dysertacja spełnia warunki określone w art.187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz.742 z późniejszymi zmianami). W związku z powyższym wnoszę o dopuszczenie mgr Katarzyny Życieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego, w tym do publicznej obrony rozprawy.



Tomasz Kobiela