

dr hab. inż. Ewelina Lipiec, prof. UJ
Instytut Fizyki
Zakład Fizyki Nanostruktur i Nanotechnologii
ul. Łojasiewicza 11, 30-348 Kraków
Ewelina.Lipiec@uj.edu.pl
+48 12 664 45 85



UNIWERSYTET
JAGIELLOŃSKI
W KRAKOWIE

Wydział

Fizyki

Astronomii

i Informatyki

Stosowanej

Kraków, 20 Stycznia, 2026

Recenzja Pracy Doktorskiej

Badanie własności fizycznych i modelowanie pęcherzyków zwnątrzkomórkowych w nano-skali z użyciem mikroskopii sił atomowych oraz analizy śledzenia nanocząstek

wykonanej przez mgr Katarzynę Życieńską

pod kierunkiem dr. hab. Macieja Kamińskiego, prof. UW
oraz dr. Józefa Gintera

w Zakładzie Fizyki Biomedycznej, Uniwersytetu Warszawskiego

Badania mikropęcherzyków są bardzo ważne dla współczesnej biologii i medycyny, ponieważ ujawniają nowy, zaawansowany mechanizm komunikacji międzykomórkowej. Mikropęcherzyki, jako pęcherzyki błonowe uwalniane przez komórki, przenoszą białka, lipidy oraz materiał genetyczny (w tym RNA i mikroRNA), wpływając na funkcjonowanie komórek docelowych. Uczestniczą one w regulacji procesów fizjologicznych i patologicznych, takich jak odpowiedź immunologiczna, angiogeneza czy procesy zapalne. Ich zdolność do modulowania aktywności innych komórek sprawia, że stanowią ważny czynnik utrzymania homeostazy organizmu oraz rozwoju wielu chorób.

Badania właściwości i składu chemicznego mikropęcherzyków mają szczególne znaczenie w kontekście diagnostyki i terapii chorób, zwłaszcza nowotworowych, sercowo-naczyniowych i neurodegeneracyjnych. Skład chemiczny mikropęcherzyków odzwierciedla stan komórki, z której pochodzą, co czyni je obiecującymi biomarkerami wykorzystywanymi w tzw. płynnej biopsji. Ponadto intensywnie bada się ich potencjał jako nośników leków i narzędzi terapii celowanej, co może przyczynić się do rozwoju medycyny spersonalizowanej. W rezultacie badania mikropęcherzyków nie tylko pogłębiają wiedzę o mechanizmach chorób, lecz także otwierają nowe możliwości diagnostyczne i terapeutyczne.

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Życieńskiej wpisuje się w ten bardzo ważny kierunek badawczy analizując właściwości fizyczne

ul. prof. Stanisława

Łojasiewicza 11

PL 30-348 Kraków

tel. +48(12) 664-48-90

fax +48(12) 664-49-05

e-mail:

wydzial.fais@uj.edu.pl

mikropęcherzyków za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM) oraz metody analizy śledzenia nanocząstek (NTA). W mojej opinii tematyka podjęta w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej znajduje się w zakresie ważnych badań biomedycznych, które w ostatnich latach intensywnie rozwijają się wraz z postępem technik biologii molekularnej i wysokorozdzielczej mikroskopii.

OGÓLNA OCENA ROZPRAWY

Rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Życieńskiej została podzielona na 5 części, które stanowią spójną całość: i) Wstęp, ii) Metodologia eksperymentalna, iii) Parametry geometryczne pęcherzyków iv) Model przylegania do podłoża v) Badanie sztywności pęcherzyków i wyznaczanie modułu zginania oraz vi) Uwzględnienie poruszania się pęcherzyków w cieczy. W ramach ogólnego podsumowania Autorka wymienia najważniejsze osiągnięcia uzyskane w ramach dysertacji.

Rozprawę rozpoczyna streszczenie, w którym nakreślono cel pracy doktorskiej obejmujący analizę własności fizycznych pęcherzyków lipidowych w nanoskali. W tej części niestety nie doszukałam się precyzyjnie sformułowanej hipotezy badawczej testowanej w ramach niniejszego doktoratu. Motywacja, która przyświecała badaniom również nie jest jasno przedstawiona, ale można ją wywnioskować z opisu dotychczasowych badań mikropęcherzyków. Na początku wstępu Autorka zamieszcza skrócony opis badań prowadzonych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej oraz podkreśla, iż wykonywane przez Nią badania mikropęcherzyków za pomocą AFM mają pionierski charakter na Uniwersytecie Warszawskim. We wstępie opisane są również mikropęcherzyki lipidowe w tym pęcherzyki wydzielane przez komórki oraz bardzo krótko liposomy i metody eksperymentalne wykorzystywane w dotychczasowych badaniach do analizy mikropęcherzyków. Wstęp obejmuje także opis metod eksperymentalnych stosowanych w niniejszej pracy: AFM oraz analiza śledzenia nanocząstek (ang. nanoparticle tracking analysis, NTA). Rozdział ten zawiera wartościowe informacje potrzebne do poznania motywacji podjęcia tematyki badawczej tej rozprawy oraz zrozumienia jej dalszych części. Nie jest on jednak napisany w sposób systematyczny i jest przeznaczony raczej dla czytelników zaznajomionych z tematyką badania mikropęcherzyków oraz stosowaną metodologią ich badania. Dodanie rysunków i schematów mogłyby znacznie wzbogacić tę część pracy i uczynić ją bardziej przystępną i zrozumiałą dla osób, które rozpoczynają pracę naukową obejmującą badania mikropęcherzyków, szczególnie, że badania mikropęcherzyków za pomocą AFM nie były wcześniej wykonywane na Uniwersytecie Warszawskim. W opisie mikroskopii sił atomowych informacje o charakterze ogólnym/uniwersalnym przeplatają się z charakterystyką systemu

używanego przez Autorkę. W mojej opinii brakuje opisu oddziaływań pomiędzy próbnikiem i próbką.

W kolejnym rozdziale „Metodologia Eksperymentalna” Pani mgr Katarzyna Życieńska opisuje wszystkie procedury eksperymentalne, jakie stosowała w swoim projekcie doktorskim. Pierwszym problemem naukowym jaki jest omawiany jest osadzanie pęcherzyków na mice. W rozdziale znajdujemy poprawny opis procedury przygotowania próbek, na podstawie którego można byłoby odtworzyć eksperyment. Moje zastrzeżenia budzi natomiast brak istotnych informacji odnośnie ładunku pęcherzyków, autorka pisze że jest ujemny, ale nie podaje informacji ile dokładnie wynosi. Dodatkowo, na podłoże nanoszono pęcherzyki zawieszone w wodzie destylowanej co może stanowić poważny problem metodologiczny w przypadku kiedy podłoże pokryte jest APTESem. Dodatkowo naładowane grupy $-NH_3^+$ przyciągają ujemnie naładowane cząsteczki. Woda dejonizowana to rozpuszczalnik o bardzo wysokiej stałej dielektrycznej (~ 80), który silnie osłabia oddziaływania elektrostatyczne, otulając ładunki swoimi dipolami (hydratacja), w wyniku tego przyciąganie grupa funkcyjna $NH_3^+ \leftrightarrow$ anion jest już dużo słabsze. Konieczne jest użycie buforu zawierającego jony (np. Na^+ , Cl^- , fosforany). Te jony ekranują ładunki tworząc tzw. chmurę jonową, dzięki czemu stabilizują lokalne pole elektrostatyczne, pozwalając na krótkiego zasięgu, uporządkowane oddziaływania w cieczy. Zastosowanie soli umożliwiłoby uzyskanie większego pokrycia powierzchni.

Część poświęcona obrazowaniu AFM nie jest napisana tekstem naukowym, który mógłby stanowić część artykułu lub rozdział monografii. Rozważania zawarte w podrozdziale Refleksje Osobiste świadczą z pewnością o dużym zaangażowaniu Autorki w wykonywanie trudnych i wymagających pomiarów za pomocą mikroskopii sił atomowych, mimo to uważam część informacji zawartych w tym podrozdziale oraz porównań za niepotrzebne, nie mają one bowiem uniwersalnego charakteru stanowiącego o wartości naukowej. Podobnie jak przedstawiony na Rysunku 4 „Schemat eksperymentu z obrazowaniem na mikroskopie sił atomowych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych”, który nie jest przejrzysty i czytelny. Wstępne opracowywanie obrazów AFM zostało wykonane i opisane poprawnie.

Trzecia część rozprawy doktorskiej poświęcona jest zmierzeniu rozmiarów badanych pęcherzyków (wysokość, szerokość połówkowa) i wyznaczeniu wielkości dla nich charakterystycznych takich jak promień krzywizny jego górnej części, oznaczany jako R_c . Parametr R_c wyznaczano w oparciu o wysokość i szerokość połówkową lub wyznaczano bezpośrednio z dopasowania do profili wysokości pęcherzyków. Otrzymano

porównywalne wyniki. W mojej opinii jest to wartościowa część rozprawy, zobrazowano setki pęcherzyków, zastosowano odpowiednie założenia i modele pozwalające na wyznaczenie wielkości geometrycznych charakterystycznych dla tych pęcherzyków. Poprawne obliczenia są poparte właściwą analizą statystyczną. Graficzna prezentacja wyników jest jasna przejrzysta i wzbogaca lekturę pracy.

Czwarta część dysertacji obejmuje analizę kąta przylegania pęcherzyków do podłoża. W tej części wykorzystując dane eksperymentalne i obliczenia teoretyczne zademonstrowano, iż kąt przylegania pęcherzyków do podłoża nie jest wielkością charakterystyczną dla danego rodzaju pęcherzyków w określonych warunkach (stężenia roztworu i siły przyciągania do podłoża) jak postulowali inni badacze.

W piątej części niniejszej pracy doktorskiej Autorka przedstawia badania właściwości mechanicznych pęcherzyków. Uwzględniając ilość przedstawionych danych można wnioskować, iż rozdział ten ma raczej wstępny charakter. Dlatego, w mojej opinii interesujące byłoby porównanie zastosowania modelu Hertza-Sneddona do otrzymanych wyników lub zamieszczenie uzasadnienia dlaczego wybrano inną metodę analizy. W tej części pracy Pani mgr Katarzyna Życieńska proponuje wyznaczenie modułu zginania pęcherzyka z wykorzystaniem zmierzonych i wyznaczonych na podstawie topografii parametrów geometrycznych pęcherzyków: wysokość i promień krzywizny oraz średnica geometryczna oraz wartości wyliczonych z modelu: modułu zginania błony pęcherzyka, ciśnienia osmotycznego oraz energii adhezji. Należy podkreślić, że w zaproponowanej metodzie korzysta się także ze stałej sprężystości pęcherzyka wyznaczonej na podstawie spektroskopii sił. Biorąc pod uwagę opisane w pracy doktorskiej trudności eksperymentalne związane z zebraniem krzywych siła-odległość z pęcherzyków oraz z wyznaczeniem stałej sprężystości na podstawie tych danych możemy wnioskować, że wyznaczony w ten sposób moduł zginania może być obarczony dużym błędem.

Ostatnia szósta część dysertacji opisuje zmiany średnic geometrycznych pęcherzyków w czasie upływającym od ich nałożenia na podłoże. Do wyliczonych średnic geometrycznych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych dopasowywano rozkład log-normal, co jest właściwym podejściem. Rozmiar średnic był analizowany po 1h oraz po 20h od nałożenia. Autorka proponuje dwa wyjaśnienia tej obserwacji: (1) dłuższy czas osadzania się większych pęcherzyków na podłożu zgodnie z opisem ruchów Browna oraz (2) rozciąganie się błony komórkowej pęcherzyków zaadsorbowanych do podłoża. Wyniki przeprowadzonych obliczeń teoretycznych sugerują, iż połączenie tych dwóch efektów może wyjaśnić obserwowaną zmianę

średnic geometrycznych w czasie. Jest to jednak jedna z kilku możliwości. Można byłoby potwierdzić pierwszą hipotezę eksperymentalnie dokładnie monitorując w czasie stopień pokrycia powierzchni pęcherzykami o różnych rozmiarach (osadzanie z kilku jednorodnych roztworów).

SZCZEGÓŁOWE UWAGI DO ROZPRAWY

Podczas czytania rozprawy nasuwają się pewne bardziej szczegółowe pytania oraz zagadnienia:

- Literatura powinna być źródłowa tzn. jeśli piszemy o pierwszym STM-ie (strona 32 Dysertacji) to w tym miejscu cytowanie należy się laureatom Nobla Gerdowi Binnigowi i Heinrichowi Rohrerowi. „G. Binnig i H. Rohrer *“Surface Studies by Scanning Tunneling Microscopy”* Physical Review Letters, 1982 rok (vol. 49, str. 57)”.
- W mojej opinii w pracy bardzo korzystne byłoby porównanie wyników otrzymanych za pomocą analizy śledzenia nanocząstek (ang. Nanoparticle Tracking Analysis NTA) z wynikami DLS (Dynamic Light Scattering). Zastosowanie DLS pozwoliłoby na wyznaczenie współczynnika dyfuzji i promienia hydrodynamicznego oraz określenie jednorodności populacji pęcherzyków. Dodatkowo należy pamiętać, iż NTA może nie być wystraszająco czułą metodą do analizy małych pęcherzyków (40-80 nm).
- Autorka podkreśla, iż przedstawione w niniejszej rozprawie badania skupiają się na metodologii podkreślając nowatorski charakter badań. Takie badania wymagają optymalizacji procedur eksperymentalnych. Które parametry modyfikowano aby otrzymać optymalne rozmieszczenie pęcherzyków na podłożu? Czy kontrolowano pH roztworów w których zawieszone były mikropęcherzyki?
- Na stronie 34 Autorka pisze o trudnościach związanych z rozpoznawaniem pęcherzyków na obrazach zebranych za pomocą AFM. Należy tutaj podkreślić, że stopień pokrycia powierzchni pęcherzykami nie był optymalizowany i nie został określony, co może być przyczyną, iż pęcherzyki były zbyt blisko (co widać na Rys. 36) lub daleko siebie (Rys. 7) zlokalizowane - co utrudniało odpowiednio wyznaczenie granic pomiędzy nimi albo zlokalizowanie odpowiedniej liczby pęcherzyków do dalszej analizy.
- Na stronie 31 przedstawione są używane próbki, których promień krzywizny ostrza wynosił 1 nm (obrazowanie) lub 10 nm (spektroskopia sił). Dlaczego do obrazowania względnie dużych

obiektów jakimi są mikropęcherzyki używano tak ostrych próbników? Zastosowanie tych próbników nie poprawiło rozdzielczości uzyskanych obrazów (biorąc pod uwagę rozmiar pikseli) a mogło doprowadzić do uszkodzenia delikatnych biologicznych próbek.

- Rysunek 35 nie jest poprawny, dźwignia próbника AFM nie wygina się w przedstawioną stronę przy naciskaniu na podłoże.
- W trzeciej części rozprawy zaobserwowano, iż średnica geometryczna pęcherzyków osadzonych na podłożu zwiększa się po 20h od osadzenia. Dlaczego nie zaplanowano i nie wykonano systematycznych pomiarów obrazowania pęcherzyków w różnych odstępach czasu po nałożeniu na próbkę?
- Jestem ciekawa zdania Autorki odnośnie innych możliwych hipotez wyjaśniających zmiany średnic geometrycznych w czasie - czy rozważano np. fuzję pęcherzyków? Jakie metody eksperymentalne można byłoby zaplanować aby sprawdzić tę hipotezę?
- Krzywe siła-odległość przedstawione na rys. 38 trudno porównać, ze względu na znacząco różniące się skale.
- Wg mnie rozprawę wzbogaciłoby systematyczne porównanie modułów zginania wyznaczonych dla przynajmniej kilku rodzajów pęcherzyków i liposomów za pomocą metody zaproponowanej w rozprawie (wykorzystującej parametry geometryczne, wartości wyznaczone z modelu oraz sztywności wyznaczonej na podstawie spektroskopii sił) oraz za pomocą metodologii używanej przez innych naukowców, która jest cytowana w niniejszej rozprawie (np. Vorselen et al. 2020).
- Niezgodność oznaczeń $A_1 - A_3$ na stronie 62

Powyższe uwagi/komentarze są sugestią do dyskusji, która może zostać podjęta podczas obrony pracy.

W mojej opinii rozprawa doktorska Pani mgr Katarzyny Życieńskiej wnosi istotny wkład do dziedziny fizyka w szczególności w zakresie biofizyki poprzez połączenie teoretycznego i doświadczalnego podejścia do badań złożonych układów biologicznych jakimi są pęcherzyki zewnątrzkomórkowe i liposomy. Należy w tym miejscu podkreślić wnikliwe podejście do opisu kształtu i rozmiarów pęcherzyków oraz zastosowanie odpowiednich modeli do wyznaczenia ich parametrów geometrycznych. Autorka wykazała także, że kąt przylegania pęcherzyków do podłoża nie jest wielkością charakterystyczną układu, co stanowi ważne doprecyzowanie istniejących modeli adhezji pęcherzyków. Interesujący jest zaproponowany sposób powiązania topografii AFM z modelem mechanicznym pęcherzyka, pozwalający — mimo ograniczeń eksperymentalnych — na oszacowanie modułu zginania błony.

Całość pracy ma wyraźnie metodologiczno-fizyczny charakter i stanowi punkt wyjścia do dalszych, bardziej zaawansowanych badań ilościowych nad mechaniką i adhezją obiektów biologicznych w reżimie nanoskali.

Podsumowując uważam, że złożona rozprawa doktorska spełnia wymagania stawiane pracom doktorskim zgodnie z ustawą o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2018 poz. 1668 z późn. zm.). Niniejszym wnioskuję do Rady Dyscypliny Fizyka Uniwersytetu Warszawskiego o dopuszczenie Pani Katarzyny Życieńskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

