

Prof. dr hab. inż. Konstanty Skalski
Sieć Badawcza Łukasiewicz – Instytut Mechaniki Precyzyjnej
ul. Duchnicka 3, 01-796 Warszawa

Warszawa, 20.07.2019 r.

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr inż. Ewy BEDNARCZYK

nt.: „BIOMECHANICZNE EFEKTY W MODELOWANIU ZMIAN

ZWYRODNIENIOWYCH STAWÓW”

Recenzję wykonałem na podstawie pisma Dziekana Wydziału Inżynierii Produkcji

Politechniki Warszawskiej z dn. 04.07.2019r.

1. Ocena wyboru tematu

Zakres tematyczny rozprawy dotyczy złożonego procesu degradacji chrząstki stawowej wynikłej z zaburzeń biologiczno-chemicznych oraz mechanicznych. Tym zwyrodniałym, chorobowym zaburzeniem, określanym jako osteoartroza (OA) towarzyszą wyrośla kostne (osteofity), stany zapalne błony maziowej, a także – w kolejnych stadiach – dotkliwe stany zapalne tkanek okołostawowych. Próby efektywnego opisu zmian zwyrodnieniowych podjęto już w pierwszych latach ubiegłego wieku (prace Garroda). Obecne badania wskazują, że mutacja genu COL2A1 prowadzi do zaburzeń kolagenu i tym samym do próby wyjaśnienia przyczyn schorzenia. Jednakże wciąż niedostatecznie rozpoznane schorzenie wymaga wnikliwych badań eksperymentalnych procesu OA. Ważną też rolę odgrywają podjęte w rozprawie badania „*in silico*” poprzez opisy fizyczne zjawisk, ich modele matematyczne oraz symulacje komputerowe. Oryginalność zaproponowanej tematyki badawczej angiogenezy nad procesem powstawania i wzrostu wyrośli kostnych jest połączona z opracowaniem na poziomie mikrostrukturalnym (komórkowym) nowych, interesujących modeli degeneracji stawu.

Choroba zwyrodnieniowa stawów (OA) jest zaliczona do 10-ciu chorób człowieka powodujących najcięższe kalectwo (zalicza się 25% ogółu chorych). Degradacja chrząstki dotyczy w Polsce ok. 2 mln osób (ok. 17% społeczeństwa). Populacja ta rozkłada się procentowo zależnie od wieku: 30% w wieku 45-65 lat, 60% w wieku 65+ oraz 80% w wieku 75+. Zależnie od płci K/M udziały procentowe dotyczą 18% K, 9% M. Mając na względzie zakres tematyczny oraz przytoczoną statystykę należy uznać, że podjęcie badań nad OA jest

całkowicie zasadne. Proponowana zaś metodologia badań posiada znaczny potencjał ich rozwijania.

2. Opis treści rozprawy

Rozprawa doktorska mgr inż. Ewy Bednarczyk liczy 120 stron wraz ze spisem 29 rysunków oraz 16 tabel, zawiera streszczenia w języku polskim i angielskim, w tym wykaz symboli. Bibliografia liczy 111 pozycji, w tym 3 pozycje współautorskie Doktorantki opublikowane w liczących się recenzowanych czasopismach.

Rozdz.1 jest wprowadzeniem w tematykę. Uzasadnia podjęcie tematu rozprawy, także cel i tezę (str.14). Sformułowane cele uzupełniające obejmują głównie modelowanie matematyczne procesów: angiogenezy, wyrosli kostnych (z angiogenezą) oraz symulacji komputerowych opracowanych modeli.

Rozdz.2 zawiera natomiast znane literaturowe, lecz ciekawe opisy tkanek oraz komórek chrzęstnych i kostnych. Ważnym opisem jest wspomniana angiogeneza, tj. tworzenie nowych naczyń krwionośnych w sieci naczyniowej w następstwie jej zaburzeń (biochemicznych i mechanicznych). Scharakteryzowano mechanobiologię i sygnalizację międzykomórkową oraz chorobę zwyrodnieniową OA i etapy jej rozwoju. Informacyjnie nadmieniono o możliwych badaniach doświadczalnych na hodowlach komórkowych dających odpowiedzi komórek na destrukcyjne obciążenia mechaniczne.

Treścią Rozdz.3 jest przegląd istniejących modeli biologicznych i matematycznych „*in vivo*” i „*in silico*”, które dotyczą zmian zwyrodnieniowych stawów. W zwięzłym i ciekawym opisie na str.36, wartym przytoczenia, Doktorantka przedstawiła złożoność problemu badawczego, który wskazuje na istotne znaczenie tkanki kostnej w OA. Brak bowiem unaczynienia tkanki chrzęstnej powoduje, że potencjalne czynniki odżywcze dostarczane do tkanki chrzęstnej są w procesie dyfuzji od strony tkanki kostnej. Przeciężenia mechaniczne chrząstki skutkują zaś zmianą jej właściwości lepko-sprężystych (zmienia się między innymi moduł sprężystości Younga). Generowane są mikropęknięcia, a przeciężane komórki obumierają. Komórki te wysyłają obronne sygnały do sieci naczyniowej w tkance kostnej – podchrzęstnej o zwiększone zapotrzebowanie na produkty odżywcze. W odpowiedzi na te sygnały inicjowany jest proces angiogenezy, tj. proces wzrostu naczyń krwionośnych w sieci w kierunku tkanki chrzęstnej. Wzrostowi temu odpowiada zmiana strukturalna, obserwowana jako jej kostnienie.

W prezentacjach literaturowych modeli OA dokonano przeglądu różnych współczesnych hipotez, m.in.

- o roli czynnika mechanicznego na powstawanie OA,
- o wzrastaniu naczyń krwionośnych w chrząstkę stawową,
- o odpowiedzi komórek chrzęstnych przy ciągłych i cyklicznych obciążeniach,
- o uwzględnianiu porowatości i właściwości mechanicznych,
- o uwzględnianiu angiogennych czynników wzrostu.

Obszernie dokonano też przeglądu literaturowego pod kątem modeli angiogenezy, w których wyróżniono m.in.:

- wpływ czynnika wzrostu na proces angiogenezy,
- rolę nowych naczyń krwionośnych w procesie formowania tkanki kostnej,
- wpływ angiogenezy na gojenie tkanki kostnej,
- wpływ na gęstość komórek nowotworowych i śródbłónka,
- różnorodne modele matematyczne wzrostu naczyń i tkanek bazujące na równaniach różniczkowych.

Ważnym elementem w tym przeglądzie jest podkreślenie znaczenia modelowania matematycznego i numerycznego, bacząc na czynniki ekonomiczne badań oraz ich interdyscyplinarność.

Fundamentalnym rozdziałem rozprawy jest Rozdz.4, liczący 52 strony. Rozdział ten obejmuje:

1. Model fizyczny i matematyczny angiogenezy z przykładową symulacją numeryczną modelu.
2. Cztery oryginalne modele OA zmian zwyrodnieniowych stawów i ich weryfikacja numeryczna.
3. Sygnałne badania odpowiedzi komórek kostnych na obciążenia mechaniczne.

Model angiogenezy oraz wspomniane oryginalne modele OA stanowią nie tylko wkład fundamentalny w rozprawie, ale wskazują - poprzez opisy zjawisk fizycznych i matematycznych – na jej wysokie wartości merytoryczne. Omówię syntetycznie te ważne modele kładąc nacisk na ich aspekty matematyczne.

Ad 1. **Angiogeneza.** Model fizyczny angiogenezy jest rozpatrywany na poziomie komórkowym (mikrostrukturalnym) ze zmianami ich podstawowych gęstości, tj. zmiany gęstości: naczyń krwionośnych, produktów odżywczych oraz komórek kostnych. W modelu

fizycznym zakłada się, że wzrost naczyń krwionośnych może występować w sieci naczyniowej już istniejącej, zaś sterowanie procesem wzrostu można realizować sygnałem biochemicznym i mechanicznym.

Model matematyczny procesu angiogenezy opisany jest 3 zależnościami różniczkowo-całkowymi, definiującymi wspomniane zmiany gęstości. I tak pierwsza zależność, tj. zmiana gęstości naczyń (wyrażona poprzez pochodną gęstości w czasie) jest więc równaniem ewolucji sterującym procesem. Miarę zaś naczyń krwionośnych określa wyrażenie całkowite z gęstości naczyń krwionośnych i z malejącej funkcji wykładniczej odległości odbieranego sygnału. Sygnałem sterującym procesem poprzez funkcję Hearviside'a jest sygnał biochemiczny gęstości produktów. Równanie to jest złożoną postacią równania różniczkowego pierwszego rzędu, którego rozwiązanie względem gęstości naczyń może prowadzić do równania całkowitego.

Pozostałe 2 zależności są prostszymi związkami równań ewolucji, które istotnie rzutują na rozwiązanie matematyczne problemu angiogenezy, w tym też na aplikację numeryczną. Równanie na gęstość produktów odżywczych zależne jest sumarycznie od gęstości naczyń krwionośnych. Natomiast zmianę gęstości komórek kostnych w czasie określa równanie ewolucji wynikłe z liniowej zależności (proporcjonalności) wyłącznie produktów odżywczych.

Przedstawione propozycje równań ewolucji są przyjętymi związkami analitycznymi w badaniach struktur kostno-stawowych. Ich uzupełnienie parametrami strukturalnymi, jak: porowatość, wzmocnienie, zasięg, pozwala na efektywną weryfikację fizykalną, a także numeryczną modelu. Przykładowym modelem obliczeniowym modelu był finalny model geometryczny uszkodzonej tkanki zębowej. Liczbę i wartość 8 parametrów strukturalnych określono najprawdopodobniej wykorzystując badania literaturowe, które zestawiono w tab. 4.1. Rezultaty jakościowe potwierdzają obliczenia numeryczne otrzymane w programie COMSOL Multiphysics.

Ad 2. **Osteoartroza.** Przedstawione oryginalne modele fizyczne i matematyczne zmian zwyrodnieniowych, jak nadmieniałem, są znaczącym osiągnięciem rozprawy. Modele te bazują na procesie angiogenezy wcześniej opisanym przez 3 równania ewolucji, wyrażające zmianę gęstości: naczyń krwionośnych, produktów odżywczych oraz komórek kostnych.

Model zmian zwyrodnieniowych oznaczony symbolem OA-I opisują 4 równania ewolucji, tj. 3 równania angiogenezy oraz 4-te równanie uzupełniające opis modelu, tj. zmianę modułu Younga. Model OA-II jest też opisany przez 4 zależności (równania), lecz jest on

rozszerzonym o efekty biologiczne i mechaniczne. Mając na względzie głębszą analizę efektów biomechanicznych do bazowych 3 równań angiogenezy w modelu OA-III dołączono 2 zależności: wspomnianą zmianę modułu Younga oraz zmianę gęstości mikropełnięć. Łączna liczba równań ewolucji w tym modelu zmian zwyrodnieniowych wynosi 5. Finalny model, oznaczony jako OA-zmodyfikowany jest 4-ro ewolucyjnym i znamieny tym, że sygnały: biochemiczny oraz mechaniczny działają w nim jednocześnie. Można zauważyć, że wraz ze wzrostem liczby równań ewolucji rośnie liczba parametrów użytych w symbolach numerycznych tych równań, co uwidaczniają stosowne tabele: I tak dla: modelu OA-I – 16 parametrów, modelu OA-II – 18 parametrów, modelu OA-III – 20 parametrów, modelu OA-zmod. – 16 parametrów.

Ad 3. Wzrost wyrośli, a obciążenia. Zależność procesu wzrostu wyrośli kostnych od obciążeń mechanicznych jest szeroko dokumentowana w literaturze inżynierii tkankowej. W pracy celem potwierdzenia negatywnego wpływu obciążeń na proces wzrostu komórek zrealizowano badania doświadczalne „*in vitro*” przy współpracy z Warszawskim Uniwersytetem Medycznym. Na zaprojektowanym, własnym stanowisku badano wysiane wcześniej komórki mysich fibroblastów. Próby przeprowadzono dla dwóch zakresów obciążeń: 800N i 1260N, dokonując zliczania komórek żywych i martwych z pomocą kamery Burkera. Eksperyment jakościowo potwierdził tezę, że przeciążenia mechaniczne komórek skutkują zwiększoną ilością martwych komórek. Natomiast ilościowa analiza i interpretacja wyników (tab. 4.14) jest mało wiarygodna.

Rozprawę zamykają Rozdz.5 Wnioski i dyskusja wraz z Rozdz.6, w którym w formie dodatku zawarto model opisujący zmiany nowotworowe tkanki kostnej. Bazowym modelem był model angiogenezy, w którym sygnały docierające do komórek krwionośnych były sumą sygnałów z komórek kostnych i nowotworowych.

3. Ocena wartości merytorycznej rozprawy

Prowadzenie badań nad biomechanicznymi efektami w modelowaniu zmian zwyrodnieniowych stawów jest zdecydowanie uzasadnione bieżącym zapotrzebowaniem na efektywne wykorzystanie korzyści, jakie dają metody modelowania oraz analizy przyczyn powstawania i przebiegu choroby osteoartrozy. Mając w szczególności kliniczne aspekty na uwadze należy raz jeszcze podkreślić, że podjęty przedmiot badań w ocenianej pracy jest całkowicie współczesny. Praca charakteryzuje się niezbędną oryginalnością i wkładem w podejmowaną tematykę. Treść rozprawy odpowiada jej tytułowi, a spis treści odpowiada jej

układowi. Układ rozdziałów odpowiada poprawnemu przedstawieniu zawartej wiedzy, zdjęcia i wykresy w zadowalający, dobry sposób ilustrują zagadnienia poruszane w tekście rozprawy. Przytoczona literatura dobrana jest w sposób wystarczający i zawiera pozycje kluczowe dla poruszanego zagadnienia oraz zagadnień pobocznych. Zawarty w rozprawie sposób i wykonanie badań świadczą o tym, że Autorka dysponuje bardzo dobrym zasobem wiedzy merytorycznej (w tym także w zakresie biomechaniki), która jest wymagana do prowadzenia samodzielnych badań naukowych.

4. Uwagi krytyczne i dyskusyjne

Rozprawa zasługuje na pozytywną ocenę w zakresie celu, tezy oraz metod naukowych przyjętych do jej udowodnienia, jak również w zakresie otrzymanych wyników, ich analizy oraz wyciągniętych wniosków. Przechodząc do uwag krytycznych wymienię bardziej istotne.

Uwagi ogólne:

1. Brak opisu rozwiązania układu równań angiogenezy oraz równań dla modeli OA.
2. Jak przebiega proces symulacji matematycznej w programie COMSOL-Multiphysics? W szczególności wprowadzania pochodnych czasowych.
3. Brak przytoczeń źródłowych ważnych zależności matematycznych modeli (wzory 4.1 ÷ 4.29). Czy wszystkie są rezultatami badań własnych?
4. Rysunki i tabele w rozprawie mają często niepełne i zbyt lakoniczne podpisy, np. Rys. 4.2 Model geometryczny do obliczeń numerycznych – Czego? dopisać należy: uszkodzonej tkanki zębowej.
5. Mankamentem rozprawy są powtarzające się nadmiernie objaśnienia tych samych zależności i oznaczeń matematycznych.
6. Jak wykorzystano w modelowaniu zależność (4.4)?
7. Wyniki obliczeń numerycznych mają charakter jakościowy. Jak wiadomo ilościowa zgodność nie jest oczywista z pogładową.

Uwagi szczegółowe:

- str. 47 – niepoprawne jest stwierdzenie o układzie 3 równań różniczkowo-całkowych,
- str. 48 – wyjaśnić zróżnicowane oznaczenia wektorowe i skalarne wielkości współrzędnej punktu oraz odległości dochodzenia sygnału,
- str. 49 – w opisie ogólnym oznaczeń winno być „wielkość gęstości”, nie „wartość gęstości”,

- str. 50 – źle opisano wzór (4.2),
- str. 66 – Tab. 4.5 przedstawia Rys., nie Tabelę, brak jego opisu,
- str. 79 – brak informacji o przemieszczeniowych warunkach brzegowych,
- str. 96 – potwierdzają słuszność zależności wzrostu wyrosli od obciążeń, zaś rezultaty z hodowli komórek są mało wiarygodne (patrz Tab. 4.10 procentowe udziały komórek).

5. Wniosek końcowy

Przedłożona do recenzji rozprawa doktorska mgr. Inż. Ewy Bednarczyk dzięki zaproponowaniu oryginalnych modeli oraz szerokiemu wykorzystaniu badań symulacyjnych odpowiada obecnym trendom rozwoju w dyscyplinie inżynieria biomedyczna. Przedstawiona metodyka badawcza „*in vitro*”, „*in vivo*” i „*in silico*” posiada potencjał do dalszego rozwijania badań nad mikrostrukturą tkanek i już obecnie stanowi zauważalny wkład Doktorantki w rozwój tej dyscypliny badań.

Praca uzyskała ocenę pozytywną ze względu na odważną analizę w rozpatrywanych zagadnieniach poprzez twórcze zaproponowanie nowych modeli oraz propozycję rozwiązania praktycznego problemu w budowie stanowiska laboratoryjnego. Wykonanie szerokiego programu badań i analiz świadczy o zaangażowaniu Doktorantki w przeprowadzone badania, a także posiadanie umiejętności samodzielnego rozwiązywania problemów naukowych w dziedzinie nauk inżynieryjno-technicznych.

Podsumowując stwierdzam, iż przedłożona rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom doktorskim w rozumieniu art. 13.1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65 poz. 595 ze zm.: Dz. U. nr 164, 2005 r., poz. 1365 i Dz. U. nr 84, 2011 r., poz. 455) i w związku z tym stawiam wniosek o dopuszczenie Doktorantki **mgr. inż. Ewy Bednarczyk** do publicznej obrony recenzowanej rozprawy doktorskiej.

