



POLITECHNIKA WARSZAWSKA
WYDZIAŁ CHEMICZNY
Instytut Biotechnologii, Zakład Mikrobioanalitiky



Prof. dr hab. inż. Elżbieta Malinowska

ul. Noakowskiego 3, 00-664 Warszawa, tel.: 022-234-5657; fax: 022-234-5631, e-mail: ejmal@ch.pw.edu.pl

Warszawa 2015-05-18

OCENA

Tytuł rozprawy doktorskiej: ***„Przenośny cytometr przepływowy jako urządzenie do badań w warunkach pozalaboratoryjnych”***

Autor rozprawy: **mgr inż. Rafał Szczypiński**

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska Pana mgr inż. Rafała Szczypińskiego pt. „Przenośny cytometr przepływowy jako urządzenie do badań w warunkach pozalaboratoryjnych” została wykonana w Instytucie Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcza PAN pod kierunkiem prof. nadzw. dr hab. inż. Doroty Pijanowskiej, znanej środowisku jako specjalistki w zakresie czujników i bioczujników oraz miniaturyzacji narzędzi i urządzeń analitycznych, w tym mikroprzepływowych bioreaktorów oraz układów bioanalitycznych z elektrochemicznymi i optycznymi systemami detekcji. Jej bogate doświadczenie w badaniach nad zastosowaniem układów mikrofluidycznych w bioanalizie odnajdujemy także w przedstawionej mi do recenzji pracy mgr inż. Rafała Szczypińskiego.

Cytometria przepływowa jest bardzo popularną metodą diagnostyczną stosowaną w analizach klinicznych do oznaczania różnego rodzaju komórek. Cytometria pozwala na ilościową i jakościową ocenę właściwości fizycznych i biologicznych komórek, a dzięki temu przyczyniła się do znacznego postępu w diagnostyce klinicznej, monitorowaniu przebiegu leczenia oraz ocenie immunomorfologicznej i czynnościowej komórek biorących udział w mechanizmach obronnych.

Opiniowana praca, przedstawiona na 117 stronach tekstu ilustrowanego licznymi rysunkami (74) i tabelami (16), ma klasyczny układ z podziałem na część teoretyczną i eksperymentalną i składa się z 8 rozdziałów. Pracę otwiera (str. 6-7) przydatny wykaz stosowanych przez Autora skrótów, zamyka ją spis literatury zawierający 185 pozycji.

W części literaturowej (35 str., 160 pozycji lit.) autor opisał zagadnienia związane z cytometrią przepływową, zaczynając od definicji metody, rysu historycznego, metod akwizycji

i analizy danych oraz przykładów jej zastosowań. Interdyscyplinarny charakter pracy wymógł na autorze także szczegółowe zapoznanie się z różnorodnymi materiałami oraz technikami stosowanymi do konstruowania bioanalitycznych układów przepływowych i trzeba przyznać, że wywiązał się ze swojego zadania całkiem dobrze. Przegląd literaturowy jest napisany przejrzysto, logicznie i dobrym językiem. Szczególnie podoba mi się podrozdział o zastosowaniu cytometrii oraz część, w której doktorant omawia miniaturowe układy pełniące funkcję mikrocytometru. Jednakże przegląd dotyczący mikrofluidyki bazuje głównie na pracach z lat 2002-2010. Warto byłoby dokładniej przyjrzeć się pracom z ostatnich 5 lat, gdyż mikrofluidyka jest dyscypliną rozwijającą się bardzo szybko. Ciekawy jest też rozdział o zaletach i wadach stosowanych układów mikroprzepływowych – szkoda, że nie pojawia się w nim żaden odnośnik literaturowy. Nieco zaskakujące jest umieszczenie celu i tez pracy pomiędzy dwoma rozdziałami przeglądu literaturowego.

Niniejsza rozprawa ma charakter doświadczalny. Jako cel pracy doktorant podał, cytując (str. 23): „opracowanie urządzenia mikroprzepływowego przeznaczonego do cytometrii przepływowej, przystosowanego do użytkowania w miejscu poza specjalistycznym laboratorium analitycznym”. Tak postawiony cel zapowiada szeroko zakrojone badania interdyscyplinarne nad miniaturyzacją oraz integracją elementów układu przepływowego i układu detekcji. Potwierdzają to niejako 2 tezy postawione w pracy. Pierwsza z nich to możliwość wykonania układu mikroprzepływowego z PDMS pozwalającego na ogniskowanie hydrodynamiczne płynów w kanale centralnym. Zostało ono zrealizowane w układzie 2D, jednak jest to rozwiązanie powszechnie stosowane i używane – co najmniej od 20 lat. Co ciekawe Doktorant pokusił się o symulację komputerową ogniskowania 3D – szkoda jednak, że nie rozwinął tego interesującego zagadnienia w pracy. Drugą tezą było opracowanie przenośnego układu do wykrywania komórek. W moim odczuciu doktorant nie osiągnął tego celu w pełni. Sam zresztą pisze w streszczeniu pracy (str 115-116), że skonstruowany układ nie może zostać uznany w pełni za przenośny.

W zasadniczej części pracy, jaką jest część doświadczalna, w rozdziałach 4-6 Autor przedstawił kolejno wyniki badań dotyczących opracowania i sprawdzenia funkcjonowania modułu przepływowego projektowanego cytometru oraz systemu detekcji optycznej. Rozdziały te można potraktować jako sprawozdanie z kolejnej serii doświadczeń bez głębszej polemiki/dyskusji w odniesieniu do istniejących już rozwiązań. Bardzo duża część pracy jest poświęcona doborowi źródła światła wzbudzającego i filtrów optycznych. Doktorant przetestował szereg dostępnych mu źródeł światła (Tabela 6) – od diod LED do diod laserowych o różnych długościach fali wzbudzenia. Związkiem, który posłużył doktorantowi do badań jest szeroko znany, powszechnie stosowany fluoresceinian sodu (doskonale znany,

opisany już w roku 1871). Natomiast rozdziały 6.6 i 6.7 dotyczące badania fantomów komórek oraz materiału biologicznego, które powinny być kluczowe w pracy, bo koncentrujące się na pokazaniu możliwości analitycznych opracowanego urządzenia jako cytometru, zostały potraktowane powierzchownie. W wyodrębnionym rozdziale zatytułowanym „Dyskusja” Autor zamieścił zestawienie wyników innych zespołów i dokonał porównania z wynikami własnymi pod kątem liczby oznaczanych obiektów. Pracę zamyka (rozdz. 8) podsumowanie informacji zawartych w rozdziałach 4-7.

Recenzowana rozprawa doktorska zawiera wartościowe elementy poszerzające wiedzę dotyczącą konstruowania modułów do przenośnych cytometrów. **Jednakże, moim zdaniem, oceniana praca wymaga wprowadzenia poprawek i uzupełnień.** Szczegółowa lektura pracy nasunęła mi następujące pytania i uwagi, które kieruję do Autora. Celem ułatwienia dokonania takich poprawek przedstawiam je poniżej.

1. W tytule rozprawy Doktorant i Promotorka bardzo szeroko zarysowali obszar tematyczny pracy doktorskiej, obiecując skonstruowanie przenośnego cytometru. Przeprowadzone badania wskazują zaś, że doktorant koncentrował się przede wszystkim na wytworzeniu układu przepływowego o określonych parametrach i optymalizacji warunków pomiarów fluorescencji. Natomiast tak ważny problem jak zminiaturyzowanie układu detekcji w urządzeniu przenośnym nie został wzięty pod uwagę. W podsumowaniu sam Autor przyznaje, że jedynie „*opracowany układ detekcyjny w postaci chipu w obudowie*” zasługuje na miano urządzenia przenośnego, natomiast pozostały sprzęt niezbędny do realizacji pomiarów to klasyczne urządzenia laboratoryjne. Wydaje się więc, że tytuł pracy powinien być mniej optymistyczny, a bardziej odpowiadać rzeczywistemu zakresowi pracy.
2. Mankamentem pracy jest brak odrębnego rozdziału obejmującego spis stosowanych odczynników i materiałów, opisy poszczególnych procedur wykonawczych i metodyki badań, tym bardziej że stosowana aparatura pomiarowa i warunki pomiarów były często zmieniane. Jest to (moim zdaniem) ważny element pracy pozwalający ocenić poprawność warsztatu doktoranta, a kolejnym czytającym daje możliwość odtworzenia doświadczeń. Ponadto, często niezmiernie istotne jest źródło, z jakiego pochodzi stosowany materiał lub odczynnik.
3. Przy przedstawianiu efektów badań w poszczególnych rozdziałach zabrakło bieżącej dyskusji wyników na tle doniesień literaturowych. W przeciwnym wypadku autorowi trudno uwypuklić elementy nowości naukowej, co ma miejsce w przypadku niniejszej pracy doktorskiej.

4. Istniejące już miniaturowe cytometry pozwalają na precyzyjne określenie np. ilości krwinek czerwonych czy białych w krwi, śledzenie cyklu komórkowego czy nawet sortowanie. W recenzowanej pracy nie określono oczekiwanej funkcjonalności, zakresu pracy urządzenia, a to uniemożliwia dokonanie właściwej oceny opracowanego systemu. Natomiast zaproponowana technologia liczenia komórek bazująca na szeregu uproszczeń i założeń ma małe szanse by być konkurencyjną czy interesującą dla innych użytkowników.
5. Dyscyplina w planowaniu i opisie wyników eksperymentu (dlaczego ten problem? co już wiadomo? jak rozwiązać?) jest warunkiem koniecznym do przygotowania wyników pracy do publikacji w uznanych czasopismach naukowych i powinna być również przestrzegana w pracach doktorskich.

Przykładowo:

Wydawać by się mogło, że atutem pracy (nowością naukową) są badania nad skurczem materiałowym podczas sieciowania PDMS (rozdział 4.3). Doktorant optymalizuje proces i dowodzi, że najniższy skurcz PDMS jest dla temperatury sieciowania równej 20°C, jednak za chwilę wspomina, że wyniki są zbliżone do tych w literaturze (artykuł z 2008 roku). Nasuwa się pytanie dlaczego przeprowadzono ponownie szczegółowe badania nad znanym powszechnie problemem.

Wiele czasu poświęcono (rozdz. 6.4) wyborowi sposobu ustawienia (współbieżnie vs. prostopadle) światłowodu detekcyjnego, względem wiązki światła wzbudzonego. Doktorant jako nowość swojej pracy (str. 104) wskazuje wprowadzenie detekcji fluorescencji w płaszczyźnie prostopadłej względem toru optycznego wiązki światła wzbudzającego, podczas gdy od kilkudziesięciu lat wiadomo, że takie ustawienie jest zalecane w pomiarach spektrofluorymetrycznych. By podkreślić wartość swojej pracy, na str. 99 Autor pisze, że podobne rozwiązanie konstrukcyjne jak jego [176] z roku 2012, inni [183] opublikowali w roku 2013. O nowości naukowej rozwiązania świadczy raczej brak wcześniejszych doniesień na dany temat.

Przy wyborze optymalnego źródła światła wzbudzającego Autor wykonał wiele eksperymentów testując różnorodne urządzenia, a mógł dokonać wstępnej selekcji biorąc pod uwagę maksimum widma absorpcji i fluorescencji fluorochromu. Wiadomo, że dla fluoresceinianu sodu maksima te występuje odpowiednio przy długości fali 488 nm i 520 nm, a doktorant dochodzi do tych wartości dopiero po wykonaniu serii pomiarów (str. 62).

Dodatkowo, Doktorant bywa niekonsekwentny w swoich badaniach. Np. na stronie 67 decyduje się na używanie filtra Carl-Zeiss 550nm, podczas gdy dopiero co wykazał, że najlepszy jest filtr Biotek 530/25 (Rys. 45).

6. Doktorant wykazał (str. 55), że pełne ogniskowanie hydrodynamiczne można uzyskać nie w układzie 2D, ale 3D. Mimo to dalsze prace kontynuował w mikroukładzie dającym niepełne ogniskowanie w kanale cytometru. Dostępu do jakiej technologii zabrakło w tym przypadku? I jeszcze jedno pytanie w tym miejscu – dlaczego prędkości przepływu płynów w kanale centralnym i kanałach bocznych dla układu 2D wynoszą odpowiednio 0,25 m/s i 0,5 m/s (Rys. 34), a za chwilę dla układu 3D z dwoma dodatkowymi kanałami bocznymi – 0,01 m/s i 0,44 m/s (Rys. 35). Trudno porównać dwa te warianty, jeśli przepływ strumienia ogniskowanego różni się tak znacznie (25x).
7. Zależności przedstawione na Rys. 63, a także ich interpretacja są dalekie od tego, czego mógłby oczekiwać analityk myśląc o krzywej kalibracji. Proszę o ich wyjaśnienie. Skąd się wzięły tak duże wartości liczbowe na skali absorbancji – takiego zakresu pomiarowego nie posiada stosowany w badaniach spektrofotometr.
8. Doktorant wszelkie eksperymenty optymalizacyjne prowadzi dla fluoresceinianu sodu w pH 9,0. Dlaczego takie środowisko wybrano dla optymalizacji metody analitycznej z udziałem komórek? Zdecydowanie jest to pH, przy którym obserwowany jest wysoki sygnał intensywności fluorescencji związku, jednak wyznakowane tym związkiem komórki w takim pH nie mają najmniejszych szans na przeżycie. Nie dziwi, że finalna analiza komórek linii C3A była dokonana w pH 7,4 (str 94).
9. Zaskakującym jest również fakt, że doktorant na str. 95 pisze (po przeprowadzeniu szeregu doświadczeń nad ogniskowaniem strumienia), że ze względu na duże rozmiary komórek w stosunku do wymiarów kanału mikrocytometru nie było konieczności przeprowadzania hydrodynamicznego ogniskowania zawiesiny w kanale. W takim razie po co przeprowadzono ponad połowę zaprezentowanych eksperymentów?
10. Badania nad analizą kulek i komórek w układzie są opisane bardzo chaotycznie i niezbyt jasno. Czy chodziło o wyznaczenie poziomu intensywności fluorescencji zawiesin komórek w medium i na tej podstawie oszacowanie ilości komórek? Wielka szkoda, że eksperymenty przeprowadzono tylko raz. Z punktu widzenia analityka, a nim jestem, można to potraktować jako badania wstępne, a nie potwierdzające poprawność działania i analityczną użyteczność tego urządzenia jako cytometru. Ponadto, nie należy posługiwać się równaniem funkcji liniowej (rys 72B) uzyskanej na podstawie 3 punktów, które nie układają się w jednej linii.
11. Zdecydowanie nie przekonuje mnie tok rozumowania Doktoranta prowadzący do wyznaczenia dwóch wartości: oszacowanej liczby kulek przepływających w ciągu jednej sekundy (370) (str 93) czy liczby przepływających komórek (23) (str 99). Doktorant bardzo optymistycznie zakłada, że podczas dozowania kulek czy komórek zawiesina jest

jednorodna – gdyż nie obserwuje aglomeracji komórek w strzykawce. Nie znalazłam też informacji na temat sposobu dostarczania roztworów do mikrosystemu. Ponadto, nieco spekulatywne/naiwne jest określenie stosunku objętości próbki do objętości jednej kulki nie uwzględniając wolnych przestrzeni, jakie znajdują się między kulkami, czy też założenie, że populacja kulek wyznakowanych izotocyjanianem fluoresceiny stanowi ok. 14% ogółu... Szereg tych założeń/uproszczeń może prowadzić do uzyskania oczekiwanych wartości.

Mam też kilka uwag szczegółowych:

- Formatowanie bibliografii pozostawia wiele do życzenia.
- Uważam, że załączony abstrakt w języku angielskim powinien zostać poprawiony pod względem stylistycznym i gramatycznym przed szerszym jego publikowaniem – miejscami jest wręcz niezrozumiały.
- Praca nie jest wolna od skrótów myślowych i usterek stylistycznych (np. „układ pomiarowy **oparty na aplikacji** LabVIEW...”, „...wartość sygnału **blanku..**”, itp.), jednakże ktoś nie popełniał takich błędów.....

O aktualności i atrakcyjności tematyki badań podjętej przez Promotorkę i Doktoranta świadczą publikacje, które ukazały się w ostatnich latach w czasopismach z listy JCR - przytoczone także w spisie literatury w ocenianej pracy. Dotychczasowy dorobek naukowy mgr inż. Rafała Szczypińskiego (według mojej najlepszej wiedzy) stanowi 8 publikacji w czasopismach technicznych (2 - *Przegląd Elektrotechniczny*, 4 - *Elektronika: konstrukcje, technologie, zastosowania* oraz 2 - *Optima Applicanta*). Na dwie z nich powołuje się autor w niniejszej dysertacji. Nie znalazłam natomiast żadnej publikacji z nazwiskiem Doktoranta, która dotyczyłaby efektów prac nad ogniskowaniem hydrodynamicznym płynu w kanale mikroukładu. Ponadto, wyniki uzyskane przez Doktoranta w ramach omawianego doktoratu opublikowane zostały jedynie w czasopismach krajowych o lokalnym zasięgu. Należy zatem postawić pytanie: z czego to wynika?

Podsumowanie

Pomimo, całego szeregu uwag z mojej strony, doceniam ciężar pracy poniesionej przez mgr inż. Rafała Szczypińskiego przy wykonywaniu prac konstruktorskich i badawczych. Ponadto recenzowana rozprawa zawiera wiele cennych informacji na temat możliwości opracowania zminiaturyzowanych modułów przepływowych. Autor wykazał wiedzę

teoretyczną, niezbędne umiejętności techniczne w zakresie projektowania i budowania mikroprzepływowych układów analitycznych z udziałem materiałów polimerowych i zastosowaniem systemu detekcji optycznej.

Ponieważ przedłożona dysertacja w wielu miejscach wymaga dopracowania (co pokazałam wcześniej), temat pracy w stosunku do jej zawartości jest zbyt szeroki, cele postawione w pracy nie zostały do końca osiągnięte, a elementy nowości naukowej niewystarczająco uwypuklone, stawiam wniosek by rozprawę doktorską mgr inż. Rafała Szczypińskiego zatytułowaną „*Przenośny cytometr przepływowy jako urządzenie do badań w warunkach pozalaboratoryjnych*” skierować do uzupełnienia i poprawy – co jest zgodne z obowiązujące przepisami dotyczącymi stopni i tytułów naukowych (*Rozporządzenie Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego z dnia 3 października 2014 r. – Rozdz. 1, § 6.6 (Dz. U. z 2014 r. poz. 1383), na podstawie art. 31 ustawy z dnia 14 marca 2003 (Dz. U. Nr 65, z późn. zm.)*).

Z poważaniem,

