

5.05.2015

Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska
Katedra Inżynierii Biomedycznej
Wydział Podstawowych Problemów Techniki
Politechnika Wrocławska
50-370 Wrocław
Wybrzeże Wyspiańskiego 27

Recenzja rozprawy doktorskiej

Przenośny cytometr przepływowy jako urządzenie do badań w warunkach pozalaboratoryjnych

Autor rozprawy: mgr inż. Rafał Szczypiński
Promotor: dr hab. inż. Dorota Pijanowska prof. nadzw.

Recenzję rozprawy doktorskiej sporządzono w związku z uchwałą Rady Naukowej Instytutu Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. Macieja Nałęcz PAN w Warszawie Pimo SPK/17/2015)

W ostatnich latach coraz większą wagę przykładą się do medycyny opartej na predykcji, prewencji i spersonalizowanym podejściu do pacjenta. Towarzyszy temu opracowywanie nowych metod diagnostycznych i udoskonalanie metod istniejących, szczególnie takich, które umożliwiają badania na poziomie mikroskopowym, albo nawet w nanoskali i to np. przy łóżku pacjenta. Coraz większą rolę we współczesnej inżynierii biomedycznej i badaniach biomedycznych; dotyczących zarówno diagnostyki, jak i terapii, odgrywają metody optyczne bądź to optoelektroniczne. Stanowią one przedmiot wielu badań podstawowych, jak i klinicznych. Jedną z takich metod diagnostycznych w szerokim arsenale metod diagnostyki laboratoryjnej - jest cytometria przepływowa, która umożliwia badania na poziomie komórkowym, wykorzystując zarówno metody rozproszeniowe (rozpraszanie światła na strukturach komórkowych), jak i fluorescencyjne. Badanie za pomocą cytometrii pozwala na charakterystykę jakościową, jak i ilościową badanych komórek.

Recenzowana rozprawa Pana Rafała Szczypińskiego dotyczy właśnie tej metody. Doktorant podjął się opracowania konstrukcji urządzenia przenośnego, które mogłoby pracować poza specjalistycznym laboratorium diagnostycznym. Zaproponował urządzenie

z poli(dimetylosiloksanu) z ogniskowaniem hydrodynamicznym do badania znakowanych fluorescencyjnie komórek.

Praca wraz z przypisami i rysunkami liczy 117 stron, z czego 22 strony (pierwszy rozdział – Wstęp) poświęcono opisowi przedmiotu badań – w tym historii cytometrii, fluorochromom, metodom akwizycji badanych sygnałów i zastosowaniom tej metody. Po przedstawieniu celu pracy w zakończeniu pierwszego rozdziału, Autor w rozdziale drugim omówił różne konstrukcje urządzeń ze względu na stosowane materiały, wskazując wady i zalety poszczególnych rozwiązań. W rozdziale trzecim skoncentrował się na mikroprzepływomierzach i mikrocytometrach. Omówił też istniejące komercyjnie rozwiązania mikrocytometrów.

Rozdział czwarty poświęcony jest części eksperymentalnej. Doktorant wskazał na zalety poli(dimetylosiloksanu) i opisał konstrukcję układu mikroprzepływowego metodą fotolitografii. Niestety rozdział ten, ważny dla całości pracy, został potraktowany dość skrótowo. Niejasne jest, jakie są rzeczywiste rozmiary matrycy i kanałów. Czy projekt według rysunku 29 (str. 50) jest zgodny z końcowym wynikiem sieciowania i ostateczną wersją urządzenia? Niejasne jest też, w jaki sposób dokonano pomiarów mierzonych odległości (rys. 27 i 28) oraz jaką metodą? Nie podano też czy zaproponowana metoda wytwarzania matrycy mikrocytometru jest powtarzalna i jaka jest powtarzalność tego procesu?

Rozdział piąty recenzowanej rozprawy poświęcony jest symulacjom komputerowym ogniskowania hydrodynamicznego płynu w kanale cytometru. Jest to bardzo ważne zagadnienie i takie podejście zasługuje na pochwałę. Szkoda, że na rysunkach i fotografiach zamieszczonych w tym rozdziale nie podano skali (podziałki pomiarowej). Dobrze byłoby również wyjaśnić, jakimi przesłankami kierował się Autor, przyjmując podane parametry fizyczne płynu osłonowego i gęstość fazy rozproszonej.

Doktorant przeprowadził również badania laboratoryjne, potwierdzając możliwość ogniskowania hydrodynamicznego do 27% szerokości kanału (w symulacji do 25%). Jednakże niejasne jest, jaki jest błąd pomiarowy, ile prób wykonano i na ilu matrycach Autor je przeprowadził?

Rozdział szósty opisuje kolejny etap pracy badawczej czyli dobór parametrów układu detekcji optycznej do pomiarów fluorescencji wybranych fluorochromów. Autor podaje, że badał dwa znaczniki fluorescencyjne: fluoresceinian sodu i rezorufinę. Testował też kilka

źródła światła, jak i badał filtry optyczne oraz sposoby prowadzenia wiązki światła. Następnie optymalizował dobór odpowiedniego detektora do rejestracji sygnału fluorescencji. Badania przeprowadził bardzo solidnie, testował różne warianty układów, decydując się na wybór odpowiedniego źródła światła i detektora oraz sposobu doprowadzania światła. Rzetelnie zajął się również doborem parametrów pracy aparatury, w tym częstotliwości i napięcia zasilania źródła światła. Do celów analizy wybrał oprogramowanie LabVIEW. Praca na pewno by zyskała, gdyby Doktorant na końcu tego rozdziału podsumował, jakie elementy i parametry ostatecznie zdecydował się zastosować.

W zoptymalizowanym układzie przeprowadził pomiary fluorescencji fluoresceinianu sodu i porównał z wynikami przed modyfikacją układu. Dokonał również pomiarów absorbancji w swoim układzie, jak i za pomocą komercyjnego spektrofotometru. Ta część jest jednakże niezbyt jasna. Można wnioskować, że Doktorant chciał wykazać, że we własnym układzie pomiarowym może mierzyć o wiele niższe stężenia fluorochromów. Przydałoby się jednak wyjaśnienie, dlaczego posłużył się pomiarem absorbancji, a nie względnego natężenia fluorescencji, skoro ten właśnie parametr stanowi o pracy cytometru?

Zaproponowany układ został następnie przetestowany na fantomach komórek, które stanowiły kulki polistyrenowe, znakowane fluorescencyjnie. Te badania posłużyły do zoptymalizowania wyboru źródła światła (wybrano diodę laserową 488 nm). Zoptymalizowane parametry zostały przedstawione na schemacie blokowym aparatury (rys. 68). Doktorant wykazał, że możliwe jest zliczenie przepływających znakowanych fluorescencyjnie kulek. Następnie przystąpił do badań na materiale biologicznym, a mianowicie na komórkach nowotworowych wątrobiaka C3A. Komórki były modyfikowane białkiem zielonej fluorescencji. Jako źródło światła wybrał diodę laserową 450 nm. Szkoda, że Doktorant nie wyjaśnił *explicite*, dlaczego zmienił poprzedni wybór i zdecydował się na inną długość fali, chociaż powodu można się domyślać. Parametry układu w całości zobrazowano na rys. 70, co stanowi dużą zaletę, gdyż pozwala śledzić tok rozumowania i daje wgląd w aktualny układ pomiarowy.

Jako czytelnik pracy, skądinąd wartościowej i ciekawej, mam jednak pewien niedosyt. Szkoda, że Doktorant nie zdecydował się na krótkie podsumowanie każdego etapu, co pozwoliłoby na śledzenie postępów, jak i osiągnięć.

W dyskusji Autor zaprezentował podsumowanie w postaci tabeli swoich wyników, jak i innych badaczy, którzy również badali zawiesiny komórek w układzie mikrocytometru z detekcją optyczną. Doktorant odniósł się również do wyników badań przeprowadzonych w zespole IBIB PAN za pomocą komercyjnego cytometru i na tej podstawie pokazał, że błąd względny pomiarów przeprowadzonych we własnym układzie wynosi ok. 12,8%. Jednakże w dalszej części Autor rozprawy nie komentuje tego wyniku i nie analizuje, z czego to może wynikać i czy możliwe jest osiągnięcie lepszych parametrów w tym zakresie.

Spis literatury zawiera 185 pozycji, głównie z piśmiennictwa światowego, w miarę aktualnych. Recenzent znalazł w spisie dwie prace, których Doktorant jest współautorem. Jako Recenzent zwróciłam się więc z prośbą o nadesłanie spisu publikacji, których Doktorant jest współautorem. Z otrzymanych informacji wynika, że Autor rozprawy ma na swoim koncie dziewięć współautorskich publikacji, opublikowanych w latach 2008-2013, w tym trzy prace w czasopismach z Listy Filadelfijskiej. Nie ma natomiast informacji na temat zgłoszeń patentowych, chociaż można byłoby się spodziewać, że zaproponowany układ ma elementy nowości, które mogłoby podlegać ochronie patentowej.

Recenzowana rozprawa doktorska, zgodnie z wymogami ustawowymi, uzupełniona jest streszczeniem w języku polskim i angielskim.

Rozprawa jest starannie zredagowana i na ogół napisana poprawnym językiem. Potknięcia językowe są nieliczne, np. niefortunne sformułowania „opartymi budową łańcuchów na atomach węgla”, str. 43 czy „natężenie fluorescencji blanku”, str. 61, są na szczęście rzadkością w tekście. W zasadzie nie stwierdzono błędów merytorycznych czy usterek w opisie rysunków i tabel.

Recenzowana rozprawa w całości stanowi wartościową pozycję i świadczy o rzetelnym podejściu Doktoranta do warsztatu pracy, a także o Jego inwencji i opanowaniu sztuki planowania oraz prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując recenzję, należy stwierdzić, że

1. Autor poprawnie sformułował cel pracy.
2. Rzetelnie przeprowadził analizę stanu wiedzy dotyczącej tematyki pracy.
3. Zaproponował własne rozwiązanie konstrukcji mikrocytometru, skonstruował takie urządzenie, dokonał modyfikacji pod kątem zoptymalizowania parametrów pracy układu i przeprowadził badania zarówno na fantomach komórek, jak i na

- komórkach nowotworowych. Przeprowadził również badania symulacyjne.
4. Część eksperymentalna została starannie zaplanowana i rzetelnie zrealizowana.
 5. Autor osiągnął wartościowe wyniki i poprawnie je zinterpretował.

Do mankamentów pracy należy natomiast zaliczyć brak podkreślenia własnych osiągnięć, brak jednoznacznego odniesienia się do własnego wkładu w rozwój tej dziedziny. Autor podkreśla, że osiągnął wyniki porównywalne z doniesieniami literaturowymi, nie wskazuje jednak wyraźnie na zalety czy unikalność zaproponowanego przez siebie rozwiązania. Miejscami praca ma bardziej charakter rzetelnego inżynierskiego raportu z przeprowadzonych badań niż rozprawy naukowej, wykazującej dbałość o szczegóły i zawierającej elementy pogłębionej analizy. W pracy nie ma też odniesienia do badań rozproszeniowych, które dają możliwość oceny cech morfologicznych badanych komórek. Czy zminiaturyzowane cytometry mają taką funkcjonalność?

Niemniej jednak należy podkreślić, że Doktorant wykonał pracę rzetelnie, a postawiony problem rozwiązywał wielowątkowo. Wykazał się zarówno zdolnościami konstruktorskimi, jak i umiejętnością badań laboratoryjnych. Wskazane powyżej mankamenty można więc potraktować jako „aberracje trzeciego rzędu”, nie umniejszają one bowiem ogólnej wartości recenzowanej rozprawy.

Mając na uwadze osiągnięte wyniki i ogólną wartość pracy oraz obowiązujące przepisy o stopniach i tytułach naukowych, uważam, że recenzowana rozprawa spełnia wymagania stawiane rozprawom na stopień doktora. Wnoszę do Wysokiej Rady o dopuszczenie Pana Rafała Szczypińskiego do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Prof. n. tech. dr hab. n. fiz. inż. lek. med. Halina Podbielska