

**Recenzja pracy doktorskiej Pana mgra inż. Witolda Postka  
pt. „ZASTOSOWANIA MIKROPRZEPLYWÓW W BIOLGII I MEDYCYNIE”,  
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Piotra Garsteckiego  
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk**

Pan mgr inż. Witold Postek ukończył studia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie na kierunku Biotechnologia, gdzie w 2012 r. obronił pracę inżynierską, a w roku 2014 pracę magisterską. Od 2014 roku realizuje program Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, którego końcowym efektem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana „Zastosowania Mikroprzepływów w Biologii i Medycynie”. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Piotr Garstecki, zaś promotorem pomocniczym dr Ladislav Derzsi. W ramach przygotowywania rozprawy opublikowane zostały cztery artykuły naukowe w renomowanych pismach, w których Pan Postek jest pierwszym autorem. Jedna z nieopublikowanych jeszcze prac jest obecnie w recenzji. Ponadto na dorobek naukowy Doktoranta składa się jedno zgłoszenie patentowe oraz jeden dodatkowy, opublikowany już artykuł, który nie został przez autora zadeklarowany jako związany z rozprawą. Autor dysertacji uczestniczył w realizacji czterech projektów badawczych finansowanych ze środków krajowych i europejskich, ponadto uczestniczył w sześciu konferencjach zagranicznych i jest laureatem licznych wyróżnień oraz stypendiów. Pan Postek uczestniczył też aktywnie w wymianie naukowej odbywając staże w ośrodkach naukowych w Holandii, Niemczech, Szwajcarii i Wielkiej Brytanii.

Jak wskazuje tytuł rozprawy niniejsza praca dotyczy zastosowania technik mikroprzepływowych w biologii i medycynie. Pomimo dosyć ogólnego tytułu dysertacji, jej zakres jest dobrze skupiony wokół problemu opracowania wysoko-przepustowej metody badania oporności bakterii na antybiotyki. Autor postawił sobie ambitne zadanie opracowania metody która pozwala na odizolowanie pojedynczych komórek bakteryjnych i zbadanie minimalnego stężenia

antybiotyku hamującego wzrost bakterii (scMIC) przy zapewnieniu dużej przepustowości badań. Dopiero operując na dużych liczbach takich komórek możliwe jest wykorzystanie zalet oferowanych przez „cyfrową biologię”. Dysertacja w uporządkowany sposób przedstawia kolejne etapy pracy, pojawiające się problemy techniczne i oryginalne próby ich rozwiązania. Niniejsza rozprawa opisuje rozwiązania pozwalające na wykonanie kolejnych etapów niezbędnych do szeroko-przepustowego oznaczenia scMIC, integrację poszczególnych części systemu. Praca opisuje również eksperymenty z użyciem skonstruowanego systemu: oznaczanie scMIC, wykazanie efektu inoculum, opis zmian morfologicznych w populacji bakterii pod wpływem pewnych antybiotyków, zróżnicowanie oporności na antybiotyk w identycznej genetycznie populacji bakterii.

Przedstawiona do recenzji praca doktorska składa się z 5 rozdziałów i liczy 177 stron. W części poprzedzającej główną część dysertacji znajdziemy dodatkowo: Podziękowania; informację o źródłach finansowania badań; Listę publikacji naukowych związanych z rozprawą; Streszczenie w języku polskim i angielskim; Listę skrótów; Spis treści oraz Motywację i Cel Badań. Pracę zamyka Bibliografia cytowanych prac zawierająca 212 pozycji.

Dwustronna „Motywacja i Cel Badań” poprzedzająca główną część rozprawy stanowi zwarte, ale wyczerpujące wprowadzenie w problematykę związaną z nabywaniem przez bakterie oporności na antybiotyki, co stanowi poważny i narastający problem dla zdrowia publicznego. Jednym z pomysłów i nadzieją na stawienie czoła tym wyzwaniom jest zastosowanie technik mikroprzepływowych do rozwijania metod diagnostycznych oraz zwiększania ich dostępności dla pacjentów. Celem pracy podjętej przez doktoranta było opracowanie szeregu rozwiązań technicznych pozwalających na przeprowadzenia oznaczenia minimalnego stężenia antybiotyku hamującego wzrost pojedynczych bakterii przy zapewnieniu wysokiej przepustowości systemu.

Rozdział pierwszy dysertacji zawiera wprowadzenie. Rozpoczyna się od omówienia podstaw mikroprzepływów z głównym naciskiem na problematykę tworzenia kropeł w takich układach. Przedstawiono tutaj również obszerny przegląd literatury na temat implementacji podstawowych procedur laboratoryjnych w układach mikroprzepływowych. Mimo pewnych niedociągnięć (patrz uwagi) wprowadzenie to dobrze zapoznaje czytelnika z podstawami mikroprzepływów i perspektywami ich wykorzystania do wykonywania operacji na płynach analogicznych do procedur laboratoryjnych. Dalsza część wprowadzenia opisuje zjawisko nabywania oporności na antybiotyki. Autor nakreśla tutaj również problematykę oznaczania oporności na antybiotyki z wyszczególnieniem efektu *inoculum*. Następnie szeroko opisany został

przegląd technik mikroprzepływowych w mikrobiologii i biotechnologii oraz sformułowanie problemu na tle omówionego stanu wiedzy. Wprowadzenie w sposób klarowny zapoznaje czytelnika z problematyką badań.

W kolejnym rozdziale „Materiały i metody eksperymentalne” autor zamieszcza informacje dotyczące użytych odczynników, bakterii, fabrykacji układów mikroprzepływowych. Opisanie są również techniczne aspekty przeprowadzonych eksperymentów jak wymuszanie przepływów i kontrolowanie koalescencji kropelek, sposób wykonywania pomiarów.

W Rozdziale 3 „Rezultaty” opisane zostały kolejne etapy pracy, pojawiające się problemy techniczne i oryginalne próby ich rozwiązania niezbędne do przeprowadzenia szeroko-przepustowego oznaczenia scMIC. Autor rozpoczyna od układu generującego szereg rozcieńczeń, w którym dzięki zastosowaniu tylko jednej pułapki odmierzającej poprawiono precyzję. Kolejnym etapem jest rozbudowa tego układu umożliwiająca niezależne dodawanie drugiej próbki.

Następnie Autor opisuje konstrukcję innego elementu systemu, który umożliwia pasywną emulsyfikację kropelek. Układ ten poprzez odpowiednią geometrię wymusza rozpad dużej kropli na wiele niewielkich kropelek. Autor opisuje kolejne udoskonalenia geometrii, między innymi dzięki zastosowaniu pochylni zamiast nagłego zwężenia, udało się rozwiązać problem zatrzymywania się niewielkiej objętości kropli z tyłu układu. Kolejnym krokiem było zintegrowanie elementu emulsyfikującego z szeregowym rozcieńczalnikiem, dzięki czemu możliwe było tworzenie ciągów małych kropelek o różnych stężeniach reagenta.

Szczególnie cennym osiągnięciem pracy jest rozwinięcie pomysłu „cystern mikroprzepływowych” czyli dużych kropelek zawierających około 1900 małych kropelek emulsji. Rozwiązanie to pozwalało na odseparowanie od siebie różnych populacji kropelek emulsji, pozwalając jednocześnie na zwiększenie przepustowości badań. Na uwagę zasługuje fakt użycia jednocześnie trzech faz płynnych co wymagało rozwiązania szeregu zagadnień technicznych związanych z kontrolą zwilżalności przez różne fazy ścianek kanałów i wężyków.

Zwieńczeniem prac było wykonanie pełnego badania oporności bakterii na antybiotyki z uwzględnieniem efektu inoculum.

Rozdział 4 zawiera dyskusję uzyskanych w pracy wyników, natomiast Rozdział 5 stanowi podsumowanie głównych wniosków pracy.

## Uwagi

- 1) Główna uwaga dotyczy użytego przez autora nazewnictwa. Nie jestem ekspertem w tej dziedzinie, ale wydaje mi się, że poprawnym tłumaczeniem zwrotu „antibiotic resistance” jest „oporność na antybiotyki”, natomiast w rozprawie użyty jest zwrot „odporność”. Oba wyrazy „odporność” i „oporność” wydają się mieć tutaj potocznie to samo znaczenie, jednak w rozprawach naukowych powinno się dołożyć wszelkich starań w celu wyeliminowania wszelkich „żargonowych” zwrotów.
- 2) Nieco rozczarowujący jest początek Rozdziału 1, gdzie omówione są liczby bezwymiarowe używane w mechanice płynów. Widać tutaj pewien brak konsekwencji, jak używanie różnych oznaczeń do opisu jednej wielkości (patrz prędkość charakterystyczna w liczbie Reynoldsa i w liczbie kapilarnej), czy też wprowadzenie lepkości kinematycznej oraz dynamicznej bez podania związku między nimi.
- 3) Najprawdopodobniej podczas opracowywania sekcji 3.1.1 „Wprowadzenie” nastąpiła awaria programu do kontroli cytowań, skutkująca zresetowaniem numeracji, przez co numery cytowań nie odnoszą się do odpowiednich pozycji w bibliografii.
- 4) W sekcji 3.1.2.3. Autor wyznacza eksperymentalnie współczynnik rozcieńczeń dla *systemu do generacji szeregu dokładnie dwukrotnych rozcieńczeń*. W układzie tym wykorzystuje się tylko jedną *pułapkę odmierzającą* do tworzenia kropeł zarówno próbki jak i rozcieńczalnika. Dzięki temu zminimalizowano rozrzut wielkości kropeł a wartość teoretyczna współczynnika rozcieńczeń takiego urządzenia wynosi 2. W szeregu prób Autor wyznacza rzeczywistą wartość współczynnika rozcieńczeń jako średnią z wielu pomiarów otrzymując wartość 1,98. Ponieważ różnica pomiędzy wartością zmierzoną a wartością teoretyczną wynosi 1% i jest mniejsza od wyznaczonego współczynnika zmienności (3,6%), to poprawne byłoby stwierdzenie, że wartość pomiaru jest zgodna z wartością teoretyczną (patrz *reguła trzech sigm*). Niepoprawne jest więc posługiwanie się liczbą 1% jako różnicą między tymi dwiema wartościami i interpretowanie jej jako dokładności pomiaru. Dodatkowo przyjęcie przez Autora, że współczynnik rozcieńczeń wynosi 1,98 wymagałoby interpretacji tego faktu, której brak w dysertacji. Oznaczałoby to, że w kolejnych operacjach urządzenia, objętość kropeł rozcieńczalnika różni się systematycznie od objętości kropeł z rozcieńczoną próbką. W jaki sposób można byłoby wyjaśnić to zjawisko? Ponadto brakuje

również oszacowania współczynnika zmienności dla wielokrotnego pomiaru stężenia w tej samej kropli. Umożliwiłoby to oszacowanie błędu powtarzalności dla użytego systemu pomiarowego i porównanie go ze współczynnikiem zmienności dla serii pomiarów rozcieńczeń. W dysertacji brak odpowiedzi na pytanie czy otrzymany rozrzut współczynnika rozcieńczeń jest wynikiem rozrzutu wielkości kolejnych kropeł, czy jest spowodowany błędem powtarzalności pomiaru.

- 5) Ryc. 15, Ryc. 18 – dodanie strzałek wskazujących kierunek przepływów znacznie ułatwiłoby zrozumienie zasady działania prezentowanych układów.

### **Podsumowanie**

Pomimo pewnych niedoskonałości, których część opisałem powyżej, stwierdzam wysoki poziom naukowy zaprezentowanej rozprawy doktorskiej Pana mgra Witolda Postka. Dysertacja stanowi spójny opis konsekwentnej, wieloetapowej pracy nad konstrukcją nowatorskiego systemu mikroprzepływowego. Na wysoką ocenę pracy składa się również jej interdyscyplinarność polegająca na połączeniu między innymi zagadnień mechaniki płynów, chemii fizycznej, inżynierii mikroprzepływów i biotechnologii. Ponadto na uwagę zasługuje fakt podjęcia się przez Doktoranta tematyki oporności bakterii na antybiotyki, która jest obecnie niezwykle istotnym wyzwaniem globalnym. Należy również zwrócić uwagę, że o wysokiej wartości prezentowanej pracy oraz jej oryginalności świadczy przyjęcie jej rezultatów do publikacji w renomowanych czasopismach o zasięgu światowym.

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgra inż Witolda Postka, stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora, określone w Ustawie z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595 z późniejszymi zmianami).

W związku z przedstawioną wyżej pozytywną oceną całej pracy doktorskiej wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie o dopuszczenie Pana mgr inż Witolda Postka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy poparty czterema publikacjami naukowymi w renomowanych czasopismach naukowych stawiam wniosek o jej wyróżnienie.

*P. Korczyński*