



Warszawa, 23 sierpnia 2019r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej**

**Pana mgr Witolda Postka**

**pt.: “ZASTOSOWANIA MIKROPRZEPLYWÓW W BIOLOGII I MEDYCYNIE”,**

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego  
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

**Pan mgr inż. Witold Postek** ukończył Studia na kierunku Biotechnologia I-go i II-go stopnia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, gdzie w 2012 obronił pracę inżynierską, a w 2014 pracę magisterską. Obecnie jest uczestnikiem programu Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, którego końcowym efektem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana **“ZASTOSOWANIA MIKROPRZEPLYWÓW W BIOLOGII I MEDYCYNIE”** wykonana pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego. Rozprawa doktorska Pana Witolda Postka obejmuje dorobek naukowy, na który składa się pięć (jeden w recenzji) artykułów naukowych opublikowanych w renomowanych czasopismach z wysokim współczynnikiem oddziaływania (IF), oraz jedno zgłoszenie patentowe. W pracach tych Doktorant jest trzykrotnie pierwszym autorem, w jednej pracy udział dwóch pierwszych autorów jest równocenny. Ponadto, Pan Postek odbył pięć zagranicznych staży naukowych w renomowanych ośrodkach badawczych (Wielka Brytania, Francja, Holandia, Niemcy) jest także laureatem jedenastu stypendiów i dwóch nagród dla młodych naukowców zarówno w kraju, jak i zagranicą.

Przedłożona do recenzji praca doktorska Pana Witolda Postka, ma moim zdaniem bardzo ogólny tytuł, sugerujący czytelnikowi, że ma do czynienia raczej z przekrojowym opracowaniem wielotomowym niż z pracą doktorską. Sama praca dotyczy jednak badań nad kroplowymi mikrosystemami przepływowymi do analiz mikrobiologicznych odporności komórek bakteryjnych na antybiotyki. Mikrosystemy typu *droplet microfluidics* opracowywane są na świecie od około 25 lat, a grupa prof. Garsteckiego, pod którego opieką Doktorant prowadził

badania, ma w tym obszarze bardzo bogate doświadczenie. Urządzenia te w sposób stabilny i bardzo powtarzalny zdolne są do tworzenia układów kropeł, są kompatybilne z różnymi systemami detekcji sygnału analitycznego oraz są przystosowane do prowadzenia wysokoprzepustowych badań o charakterze podstawowym i aplikacyjnym m.in., co w swojej rozprawie wykazał Doktorant, obecnie niezwykle istotnego zjawiska antybiotykoodporności bakterii.

Praca doktorska Pana Witolda Postka, oprócz streszczeń w języku polskim i angielskim, podziękowań, dorobku naukowego, przedstawienia celu oraz motywacji do podjęcia badań, obejmuje 177 stron i podzielona jest na pięć zasadniczych części. **Rozdział 1** stanowi 38 stronicowe „Wprowadzenie”, w którym Autor, cytując 161 pozycji literaturowych, przedstawia zagadnienia dotyczące teoretycznych zagadnień związanych z mikroprzepływami i różnymi technikami mikroprzepływowymi z głównym naciskiem położonym na systemy kroplowe. Autor zwraca uwagę m.in. na procesy generowania kropeł, możliwości prowadzenia emulsyfikacji oraz kontrolowanego rozcieńczania badanej próbki zarówno w układach jedno, jak i wielofazowych także z wykorzystaniem pułapek hydrodynamicznych. Doktorant krytycznie analizuje przedstawiane konstrukcje mikrosystemów, wskazując ich zalety, wady oraz obszary, w których dana konstrukcja mogłaby być udoskonalona. Dalsza część „Wprowadzenia” poświęcona jest analizie dostępnej literatury związanej z antybiotykoodpornością, której istotę, najważniejsze mechanizmy oraz sposoby jej określania omawia Doktorant. Autor podkreśla wagę tego zagadnienia, jednocześnie zwraca uwagę na uciążliwość prowadzenia badań antybiotykoodporności metodami konwencjonalnymi, dostrzega także możliwości udoskonalenia i usprawnienia wielu procedur badawczych przez zastosowanie dobrze zaprojektowanych wysokoprzepustowych mikrosystemów kroplowych umożliwiających kontrolowane i precyzyjne prowadzenie wielu operacji jednostkowych równoległe. Na zakończenie części literaturowej Pan Postek, krótko omawiając czasochłonne i żmudne kolejne etapy procedury wyznaczania MIC i scMIC (minimalne stężenie hamujące dla pojedynczej komórki), formułuje zwięzłe tezy swojej rozprawy. Stwierdza, że:

- w porównaniu z MIC, wyznaczenie tego parametru dla pojedynczej komórki wymaga kolejnej operacji jaką jest szeregowo rozcieńczenie roztworu badanego leku;
- możliwa jest konstrukcja mikrosystemu opartego o generowanie kropeł do przeprowadzenia oznaczenia scMIC
- skonstruowany mikrosystem umożliwi także obserwację efektu inoculum, zmian morfologicznych badanego materiału biologicznego oraz dystrybucji oporności w identycznych populacjach.

**Rozdział 2** pracy to **część eksperymentalna**, w której Autor wymienia odczynniki chemiczne oraz materiały (w tym szczepy bakterii) stosowane do przeprowadzenia

eksperymentów, opisuje również procedury wytwarzania mikroukładów, procedury formowania i operacji prowadzonych na generowanych strumieniach kropeł, procedury pomiarowe oraz oprogramowanie stosowane do kontroli pracy zestawu pomiarowego, a także do przeprowadzenia niezbędnych obliczeń i analizy rejestrowanego obrazu. W tej części pracy zabrakło mi niestety schematu obrazującego technologię wytwarzania mikrosystemów oraz prostego schematu zestawu pomiarowego.

W **rozdziale 3** mgr inż. Witold Postek omawia uzyskane wyniki badań. Autor podzielił ten rozdział na cztery logiczne części, w których, po krótkim wprowadzeniu, omawia, w bardzo drobiazgowy sposób, kolejne konstrukcje mikrouządzeń zaprojektowane do prowadzenia, wymienionych w podsumowaniu części literaturowej, operacji jednostkowych ostatecznie prowadzących do oznaczenia antybiotykooporności bakterii. Wśród kolejnych etapów procedury analitycznej Autor wymienia: (i) precyzyjne rozcieńczenie w kroplach o objętości  $1 \mu\text{L}$ , (ii) pasywną emulsyfikację, (iii) separację emulsji z detekcją wzrostu bakterii po ich inkubacji z badanym lekiem, (iv) ilościowe oznaczenie odporności bakterii (w tym również pojedynczych komórek) na badany antybiotyk. W **rozdziale 3.1** Doktorant przedstawił projekt geometrii mikrosystemu do dwukrotnych rozcieńczeń kropli wykorzystującego dwie pułapki hydrodynamiczne – „odmierającą” i „łączącą”. Następnie dokumentuje kolejne etapy opracowanej procedury rozcieńczania zdjęciami mikroskopowymi opatrzonymi precyzyjnymi opisami przedstawianych sytuacji. O ile opisy te znajdują się bezpośrednio pod fotografiami, śledzenie eksperymentu jest stosunkowo łatwe. Nieco bardziej skomplikowane dla czytelnika staje się to, gdy zdjęcia zajmują całą stronę a drobiazgowy opis Autor umieszcza na stronie następnej – np. Ryc. 18. Wówczas może warto byłoby dodać na zdjęciach choć szczątkowe informacje, co dzieje się w danym etapie eksperymentu. Do oceny współczynnika rozcieńczeń uzyskanego w opracowanym mikrosystemie Pan Postek wykorzystał roztwór rodminy o określonym początkowym stężeniu  $50$  i  $100 \mu\text{M}$ . Stwierdził też, że początkowe rozcieńczenia charakteryzowały się nieliniową zmianą intensywności fluorescencji. Tu chciałbym poprosić Doktoranta o informacje czy dwukrotne rozcieńczenia roztworów rodminy wykonane w makroskali również dają nieliniowe zmiany intensywności fluorescencji. Kierując się ciekawością naukową i poznaniem zjawiska warto by było taką sytuację opatrzyć krótkim wyjaśnieniem. Nie mniej jednak, opracowana procedura dawała satysfakcjonujące efekty – współczynnik rozcieńczeń  $1,98$  i  $1\%$  precyzję. Badania antybiotykooporności wymagały także od Doktoranta opracowania kolejnej operacji – niezależnego dodawania do kropli o określonym składzie kolejnego składnika. W związku z tym Autor zaproponował modyfikację poprzedniego mikrosystemu polegającą na wprowadzeniu wlotu składnika o stałym stężeniu, oraz tzw. „magazynu” – mikrokanalu służącego hydrodynamicznego, kontrolowanego przesyłania kropli do pułapki „łączącej”. Zmodyfikowany mikrosystem był także bardzo udaną konstrukcją –

doktorant uzyskał doskonałe wyniki rozcieńczeń oraz dodawania niezależnego składnika – wysoka precyzja i dokładność przy zadowalających współczynnikach rozcieńczeń.

Kolejnym etapem w projektowanej kroplowej analizie antybiotykoodporności była pasywna emulsyfikacja pozwalająca na generowanie mikrolitrowych strumieni kropeł o jak najbardziej zbliżonej objętości, która umożliwiłaby pełną kontrolę stężeń testowanego antybiotyku oraz ilości badanych bakterii. W tej części pracy (**rozdział 3.2**) omawia opracowane w innych zespołach konstrukcje umożliwiające emulsyfikację, wskazuje na ograniczenia tych układów i proponuje własne rozwiązania oparte o zastosowania „pochylni” o określonym nachyleniu, precyzyjne przewężenia mikrokanałów oraz układy wielu dysz wydajniej generujących emulsje o precyzyjnie kontrolowanych parametrach. Kolejnym etapem badań Doktoranta była separacja emulsji kropeł pożywki z bakteriami oraz badanym antybiotykiem w różnych stężeniach. Niezwykle ważną operacją była też kontrolowana inkubacja badanych emulsji w podwyższonej temperaturze, optymalnej dla wzrostu bakterii, a następnie detekcja intensywności fluorescencji i analiza otrzymanych obrazów mikroskopowych. Ten etap pracy został opisany przez Autora w **rozdziale 3.3**. Bazując na doniesieniach literaturowych, Pan Witold Postek zaproponował wykorzystanie, co mim zdaniem jest bardzo ciekawe, trzeciej fazy do oddzielenia makrokropeł (zwanych przez autora cysternami) z mikroemulsjami zawierającymi ok. 2000 mikrokropeł, następnie wprowadzenie ich do przewodów polietylenowych, co umożliwiło kontrolowaną inkubację, po której ponownie wprowadzane były do mikrosystemu detekcyjnego. Generowane mikroemulsje, co ważne, charakteryzowały się, w przeciwieństwie do innych rozwiązań, 50% upakowaniem oraz wysoką stabilnością i powtarzalnością. Ten fragment prac wymagał od Doktoranta rozwiązania szeregu problemów takich jak: dobór średnicy przewodów polietylenowych, dobór stężenia surfaktantu, wpływającego na stabilność generowanych emulsji (także w trakcie pomiarów fluorescencyjnych), dobór geometrii kanału umożliwiającego wprowadzenie badanych mikroemulsji do obszaru detekcji tak, by mikrokrople nie pozostawały w narożach mikrokanałów, co mogłoby powodować błędy pomiarowe (kontaminację). Doktorant w bardzo pomysłowy sposób (analizując obrazy mikroskopowe) analizował to niekorzystne zjawisko wyznaczając liczbę tzw. kropeł „zakażających” mikroemulsje – średnio było to 7-8 mikrokropeł na emulsję zawierającą prawie 1700 mikrokropeł.

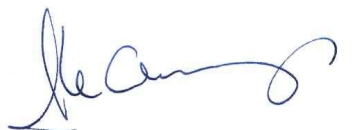
W następnym podrozdziale Pan Postek opisał wyniki integracji opracowanych konstrukcji i wykorzystanie ich od określenia parametrów MIC i scMIC antybiotykoodporności bakterii *E. Coli* dla różnych ilości bakterii w mikrokroplach oraz dla różnych stężeń cefotaksymu. Przeprowadzone eksperymenty pozwoliły Doktorantowi nie tylko wyznaczyć założone parametry, ale także zaobserwować efekt inoculum oraz zmiany morfologiczne populacji bakterii inkubowanych w różnych stężeniach badanego antybiotyku. Świadczy to o wysokiej uniwersalności opracowanego urządzenia i o jego dużym potencjale aplikacyjnym.

W „Dyskusji” i dalej we „Wnioskach” Autor omawia i porównuje swoje zaproponowane rozwiązania i procedury z opracowaniami proponowanymi przez innych autorów. Czytając prace doktorskie, zawsze zwracam uwagę aby nie były one „dziennikiem laboratoryjnym”. Praca Pana Postka takim dziennikiem oczywiście nie jest, a odniesienia do prac innych autorów i krytyczna ocena swoich opracowań to elementy bardzo wartościowe, świadczące także o dojrzałości badawczej Doktoranta i wysokiej wartości naukowej przedstawionej do recenzji pracy. Praca pod względem zaplanowanych badań jest przemyślana, spójna a jej układ bardzo logiczny. Do zawartości merytorycznej i sposobu analizy wyników trudno jest mieć jakieś uwagi, ale z racji powierzonej mi roli recenzenta poprosiłbym Doktoranta o komentarz i wyjaśnienie liniowości rejestrowanej intensywności fluorescencji dla różnych stężeń barwnika. Czy Doktorant pokusił się o sprawdzenie jej w „makroskali” żeby dowiedzieć się z czego ta nieliniowość może wynikać? Domniemanie Autora, może nieco na wyrost, jest też niepoparta badaniami propozycja dalszej miniaturyzacji mikrosystemu przez skrócenie „pochyliń” i zmniejszenie kąta jej nachylenia do 2,5 stopnia. Kolejnym ciekawym zagadnieniem, które można by skomentować jest możliwa migracja bakterii między mikrokroplami emulsji.... Czy na jakimś etapie badań udało się ją zaobserwować? Autor wspomina także o transporcie antybiotyku między makrokroplami z mikroemulsjami ... Czy można zaproponować konkretną metodę oceny tego zjawiska.

Niewdzięczna rolą recenzenta jest także ocena strony edycyjnej i językowej recenzowanej pracy doktorskiej. Pod względem edycyjnym napisana jest bardzo starannie, choć pod względem stosowanego przez Autora języka pozostawia bardzo wiele do życzenia i jest to jej najsłabsza strona. Już w tytule pracy na stronie tytułowej pojawia się pierwsza „literówka”. Dalsze błędy interpunkcyjne, ortograficzne i językowe, często wynikające z niefortunnych tłumaczeń, znalazłem na ponad 50 stronach pracy. I o ile, w dobie powrotu do pisma obrazkowego, można starać się usprawiedliwić młodzież z braku przywiązywania wagi do interpunkcji, to na etapie przygotowania pracy doktorskiej ortografia i niefortunne, automatyczne tłumaczenia są po prostu rażące i niewłaściwe. Tu wspomniałbym o „rynsztoku” (*ang. gutter*), „jednostkach arbitralnych” (*ang. arbitrary units*) zamiast umownych, „skorupie” (*ang. shell*), „efekcie odchylnym w stronę...”, „kymografie” z rys. 5, „kompartymencie” zamiast kompartmentach lub po prostu obszarach, „paraleliacji” zamiast paralelizacji, „pomiarach fluorescencji”, „kroplach pozytywnych i negatywnych”, „ucieczce i ewakuacji kropeł nadciągających jedna po drugiej...” poprzez „wijący się kanał”, „cysternach” (sugerujących raczej makroskalę prowadzonych eksperymentów), w których pod kątem mierzy się fluorescencję. Często zdania formułowane przez Autora wymagają od czytelnika skupienia na najwyższym poziomie, a i tak pozostają praktycznie niemożliwe do zrozumienia. Tu pozwolę sobie zacytować Autora: „*Powstawanie przewężenia powoduje spadek ciśnienia fazy ciągłej wokół przewężenia, co powoduje ruch wsteczny płynu ze zbiornika do przewężenia, co napędza zwężanie się przewężenia*” oraz „*Zatykano przewód ze strony dalszej od układu, w którym*

*wygenerowano wcześniej emulsje. Następnie wyciągano przewód z układu do generacji i zatykano przewód z tej strony.*” – koniec cytatu. Praca pod względem językowym zawiera też mnóstwo kontrastów np. wyszukane wyrażenie „konceptualizacja operacji” sąsiaduje z wychodzącym z użycia i archaicznym „wpierw”. Nieco zabawne wydają się także określenia typu „populacja bakterii składająca się z pojedynczej bakterii”, oraz propozycje Autora podkreślające funkcjonalność i zalety opracowanych przez niego rozwiązań: „metody mogą być wykorzystane niemal natychmiast... przez każdego kto zechce...”. Ponadto Doktorant pasjonujący się mikroskalą, często argumentujący swoją pasję ekologią i minimalizacją zużycia materiałów i odczynników, powinien pomyśleć także o dwustronnym druku swojej 177 stronicowej rozprawy.

Podsumowując, przedłożona do recenzji praca doktorska autorstwa Pana Witolda Postka reprezentuje wysoki, interdyscyplinarny poziom naukowy. Zaproponowane przez Doktoranta kroplowe mikroukłady przepływowe to konstrukcje przemyślane z dużym potencjałem aplikacyjnym, szczególnie w nowoczesnej mikrobiologii. Z pełnym przekonaniem stwierdzam także, że recenzowana rozprawa doktorska odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dn. 14 marca 2003r o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. Nr 65/2003 poz. 595 z późniejszymi zmianami) i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pana mgr inż. Witolda Postka do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Michał Chudy