



Warszawa, 5 maja 2023

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr. Artura Ruszczaka

pt.: Improvement of microbial assays in water-in-oil droplets

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego, prof. Ott Scheler'a
oraz dr. Ladislava Derzi'ego
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pan **mgr Artur Ruszczak** ukończył studia magisterskie na Uniwersytecie Łódzkim na kierunku Biologia, broniąc w 2012r pracę magisterską z obszaru mikrobiologii pod kierunkiem prof. Henryki Długońskiej. Pan Artur Ruszczak od 2012 realizuje program międzynarodowych studiów doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie, krórczym zwieńczeniem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt.: “ **Improvement of microbial assays in water-in-oil droplets**”, wykonana pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego oraz prof. Ott Schellera pod opieką naukową dra. Ladislava Derzi'ego. Praca doktorska p. Ruszczaka napisana jest na podstawie dwóch publikacji naukowych opublikowanych w 2016 i 2023r odpowiednio w *ACS Applied Materials and Interfaces* oraz *Analytical Chemistry*, a więc w bardzo prestiżowych czasopismach naukowych. W pracy z 2023r Doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto, w dorobku naukowym p. Ruszczaka znajduje się jeszcze osiem artykułów naukowych w czasopismach z listy filadelfijskiej, co wskazuje na dużą aktywność publikacyjną Doktoranta. Artykuły te również opublikowane są w renomowanych czasopismach, wśród których wyróżnić można oprócz *Analytical Chemistry*, takie czasopisma jak: *LabChip*, *Nanomaterials*, *Micromachines*, *Scientific Reports* i *Micromachines*.

Recenzowana praca doktorska dotyczy **opracowania mikrokroplowych strategii prowadzenia badań mikrobiologicznych**, które byłyby bardziej wiarygodne, charakteryzowały się bardzo dobrymi parametrami analitycznymi i mogłyby stać się standardem np. w badaniach aktywności nowych leków przeciwbakteryjnych.

Rozprawa doktorska Pana Artura Ruszczaka napisana jest w języku angielskim, podzielona jest na cztery główne rozdziały i obejmuje 113 stron. Po jednostronicowych streszczeniach w języku polskim i angielskim, liście skrótów stosowanych w pracy, Autor umieścił część literaturową, w której cytuje łącznie 136 pozycji literaturowych. **Rozdział 1** to wprowadzenie czytelnika w obszar miniaturyzacji, mikroprzepływów oraz prowadzenia analiz i badań w mikroskali z wykorzystaniem systemów typu Lab-on-Chip. Przedstawiony przez Doktoranta krótki rys historyczny wskazuje kolejne dokonania w obszarze mikroanalitiky, począwszy od miniaturowego zintegrowanego chromatografu gazowego (1970r), przez koncepcję Manz'a z 1990r budowy zintegrowanego systemu do kompleksowej analizy chemicznej (microTAS), opracowanie technologii miękkiej litografii umożliwiającej wydajne i tanie wytwarzanie mikrosystemów przepływowych z poli(dimetylosiloksanu), po wysokoprzepustowe systemy z przepływami kroplowymi (*ang. droplet microfluidics*). Pan Ruszczak wskazuje szereg zalet systemów DMF, przybliża czytelnikowi ten obszar mikroanalitiky i omawia sposoby generowania uporządkowanych strumieni kropeł w mikrokanalach z częstotliwością dochodzącą obecnie nawet do setek kHz! Dzięki temu oraz nowym technikom generowania kropeł w skali kilku mL, układy te stały się bardzo popularne w mikrobiologii, choć **wciąż niestety nie są uznane za narzędzia standardowe**. Spełniają one ponadto wymagania związane z: **(i)** wymianą gazową między środowiskiem wzrostu mikroorganizmów a fazą otaczającą kroplowy mikrobioreaktor; **(ii)** kontrolą składu pojedynczych kropeł; **(iii)** szybkim i wydajnym mieszaniem w porównaniu z mikrosystemami z jednofazowym przepływem laminarnym oraz detekcją, wizualizacją i oznaczaniem bakterii rosnących w pojedynczych kroplach. Doktorant wskazuje także na możliwość wykorzystania systemów z przepływami kroplowymi w diagnostyce i badaniach klinicznych nad wrażliwością i opornością mikroorganizmów na antybiotyki. Na przykład systemy ddPCR umożliwiają szybką detekcję patogenów, systemy ddLAMP połączone z układem pomiaru kąta zwilżania za pomocą smartfonu są w stanie zidentyfikować komórki bakteryjne w próbkach rzeczywistych w czasie poniżej 5 min. Wykorzystując mikrosystemy kroplowe można obecnie analizować duże populacje bakterii, poszukiwać anatybiotykoopornych subpopulacji mikroorganizmów oraz np. badać zjawiska „współpracy międzybakteryjnej” w celu uzyskania tolerancji na antybiotyki.

Następnie p. Ruszczak przedstawia rodzaje biokompatybilnych faz olejowych i ich funkcje w mikrosystemach z przepływem kroplowym ze względu na typ hodowanych mikroorganizmów. Stosowane fazy olejowe powinny także zapewniać praktycznie zerową rozpuszczalność badanych substancji oraz brak transportu między pojedynczymi kroplami w generowanych emulsjach. Zaproponowane oleje perfluorowane są ponadto kompatybilne materiałowo z PDMSem – polimerem szeroko stosowanym do wytwarzania systemów typu LoC. Znaczną część wstępu literaturowego Doktorant poświęca omówieniu budowy oraz funkcji surfaktantów ze względu na ich wykorzystanie jako dodatków do fazy olejowej w mikrosystemach kroplowych. Autor podkreśla

najważniejsze cechy takich związków i wskazuje na: biokompatybilność, długotrwałą stabilizację generowanych emulsji w-o, odporność na warunki, w których, prowadzona jest hodowla mikroorganizmów, brak adsorpcji na powierzchni hodowanych mikroorganizmów, a ze względu na bardzo szybki proces generowania kropeł, stosowane surfaktanty powinny szybko dyfundować do powierzchni kropli żeby zapewnić maksymalną stabilność emulsji. W rozdziale tym omówiony został także wpływ struktury (obecności odpowiednich grup funkcyjnych) cząsteczek surfaktantu na jakość prowadzonych badań ze szczególnym podkreśleniem konieczności minimalizacji/blokowania wycieku badanych związków) z wnętrza kropli do fazy olejowej, co może powodować ich transport do kolejnej kropli i w konsekwencji zafałszowanie uzyskiwanych wyników. Pan mgr Ruszczak na koniec podkreśla konieczność poszukiwania nowych surfaktantów do zastosowań w kroplowych systemach dla mikrobiologii.

Kolejną częścią przeglądu literatury Doktorant poświęca omówieniu ograniczeń systemów kroplowych, wskazując m.in. na niestabilność emulsji, transport związków chemicznych między kroplami, wyciek substancji z wnętrza kropli do fazy olejowej, możliwość tworzenia odwrótnych miceli, co mogłoby za ich pośrednictwem umożliwiać transport między kroplami, możliwość transportu przez dwuwarstwą generowaną na styku kropeł. Autor, na zakończenie tego podrozdziału, krytycznie stwierdza, że w bardzo wielu doniesieniach literaturowych pojedyncze krople niekoniecznie powinny traktowane być jako izolowane środowiska. Wskazuje także na konieczność bardzo starannego projektowania takich systemów szczególnie przeznaczonych do zastosowań mikrobiologicznych ponieważ złożone procesy fizykochemiczne w nich występujące mogą znacząco wpływać na funkcje życiowe mikroorganizmów hodowanych w izolowanych kroplach, a tym samym zaburzać wyniki prowadzonych eksperymentów. Ten fragment pracy napisany jest w sposób zwięzły, zrozumiały, a ilustracja graficzna omawianych zagadnień jest bardzo dobra.

W **rozdziale 1.7** swojej pracy Pan Ruszczak, wobec niestabilności układów potrójnych, występowania transportu molekularnego oraz ograniczonej wiarygodności mikrosystemów kroplowych w badaniach klinicznych, formułuje cele i obszary swoich badań. Zaproponował sprawdzenie/weryfikację tezy, **choć wprost niestety niesformułowanej**, czy modyfikowana łańcuchem dodecylovym resazuryna spełni lepiej zadanie markera metabolicznego w porównaniu z komercyjnie dostępną i standardowo stosowaną resazuryną. W tym celu Doktorant zaproponował **3 etapy realizacji tego celu**:

- porównanie czasu wykrycia kropeł z bakteriami dodatkowo zawierających testowane markery,
- określenie czasów różnicowania po których można zarejestrować zarówno krople dodatnie jak i ujemne,
- ocenę jakości sygnałów analitycznych generowanych przez dodecyloresorufinę i resorufinę.

Drugim celem badawczym Doktoranta było określenie parametrów fizykochemicznych, które mogłyby być wykorzystane do przewidywania profili wycieku/transportu antybiotyków, których aktywność badana jest w mikrosystemach z układem generowania strumieni kropeł zawierających mikroorganizmy. Tutaj także **niestety Doktorant nie sformułował wprost swojej kolejnej hipotezy badawczej** – szkoda. Do weryfikacji/sprawdzenia czy realizacja tego założenia jest możliwa Pan Ruszczak zaproponował 4 etapy prac:

- wyznaczenie profili wycieku 15 antybiotyków podczas testu żywotności bakterii,
- poszukiwanie korelacji między 36 parametrami związanymi z hydrofilowością / hydrofobowością badanych antybiotyków a ich wyciekiem na zewnątrz kropli,
- budowę teoretycznego modelu wycieku dla 100 antybiotyków z różnych grup oraz jego weryfikację dla 3 losowo wybranych,
- sprawdzenie czy inne parametry wpływają na szybkość wycieku antybiotyków z pojedynczej kropli.

Już na wstępie części eksperymentalnej (str. 50) Pan Ruszczak wspomina o mechanizmie wycieku C12R i jego związku z przepuszczalnością komórkową... **czy ta przepuszczalność w przypadku resorufiny jest inna?** Tu poproszę Doktoranta o bardziej szczegółowe wyjaśnienie tego sformułowania. Dalej, w części eksperymentalnej pracy, Autor zaproponował wykorzystanie 2 szczepów bakterii, z których jeden wykazywał nadekspresję białka fluorescencyjnego. Ponadto, do przeprowadzenia badań konieczne było zastosowanie mikrosystemów opracowanych w grupie prof. Garsteckiego (niestety nie wiem czy przez Doktoranta?), odpowiedniej fazy olejowej z 2% dodatkiem trójblokowego surfaktantu.

Mgr Artur Ruszczak, omawiając wyniki badań, często skraca tok myślowy mówiąc o sygnałach pochodzących od kropeł z resazuryną w obu odmianach, a przecież fluorescencję wykazuje produkt metabolizmu mikroorganizmów – resorufina również ta modyfikowana łańcuchem dodecylovym. Na stronie 53 pojawia się określenie „**aktywność fluorescencyjna C12R**” – czego dotyczy to pojęcie? Badając potencjalną toksyczność obu markerów wobec bakterii z nadekspresją GFP, p. Ruszczak przedstawia wykres zależności emisji fluorescencji w zależności od czasu. Nie dość, że brak jest odpowiedniego opisu osi czasu to jeszcze, mimo nieliniowej skali, która utrudnia śledzenie zależności, punkty doświadczalne są połączone między sobą liniami prostymi – skąd wiadomo że między każdymi 2 punktami zależność jest prostoliniowa? Ponadto, przecież między 6 i 7 godziną eksperymentu a 15 i 24 odległość na skali powinna być różna. Taką nieliniową skalę powinno się stosować raczej do wykresów słupkowych niż punktowych... Na wykresie tym brakuje też informacji jak Doktorant wyznaczył niepewności pomiarowe – tzw. słupki błędów. Omawiając wyniki Autor kilkakrotnie **zamiennie stosuje skrót C12R** w stosunku do pochodnej resazuryny, pochodnej resorufiny a na domiar złego w spisie skrótów pojawia się jeszcze trzeci związek – **dodecyloresarufina**. Tu muszę powiedzieć, że recenzent pogubił się nieco ponieważ śledzenie

toku rozumowania Doktoranta przy swobodnym stosowaniu różnych nazw było znacznie utrudnione.

Z drugiej strony czułość i specyficzność testu z wykorzystaniem C12R i resorufiny bardzo czytelnie przedstawiają krzywe ROC, z których jasno wynika przewaga stosowania dodecylovej pochodnej jako markera. W **rozdziale 2.7**, o ile indeks Youdena, jak i stosunek sygnału do szumu SNR omówione są bardzo dobrze, to sprawa obrazowania tych parametrów (**rysunki 24 i 25**) ma się już trochę gorzej – mam te same uwagi co do skali i łączenia punktów na wykresach jak w przypadku **rys.18**. Nie mniej jednak, Doktorant wyznaczając te parametry ponownie wykazał przewagę stosowania C12R. Na zakończenie rozdziału 2, trochę zaskakująco, pojawia się wyczerpujący opis metodyki badawczej ze szczegółami technicznymi przeprowadzonych eksperymentów. Jako recenzent spodziewałem się raczej komentarzy Doktoranta odniesienia do prac innych zespołów i **dyskusji naukowej, której niestety nie znalazłem w pracy**. Jej brak praktycznie uniemożliwia ocenę na ile wyniki zawarte w rozdziale 2 charakteryzują się nowością naukową, której uwypuklenie jest konieczne do uzyskania stopnia doktora. Oczekuję od Autora właśnie takiej merytorycznej wyczerpującej dyskusji i krytycznej oceny swoich wyników na publicznej obronie pracy.

Trzeci rozdział pracy mgr. Ruszczaka przedstawia badania możliwości przewidywania profili wycieku antybiotyków z wnętrza kropeł do fazy olejowej na podstawie ich właściwości fizykochemicznych. Nie bardzo wiem czego dotyczy ten niepodpisany obrazek na początku rozdziału.... Do badań Doktorant wybrał antybiotyki z czterech grup: aminoglikozydów, betalaktamów, tetracyklin, fluorochinolanów oraz kilka niesklasyfikowanych. Idea prowadzenia badań bardzo czytelnie schematycznie przedstawiona jest na rysunkach 27 i 28. Autor wybrał 36 parametrów, które mogłyby posłużyć do konstrukcji modelu wycieku antybiotyków z kropeli stwierdził, że dwa główne deskryptory mogą być wykorzystane do tego celu – współczynnik podziału i cząstkowa powierzchnia polarna cząsteczki (pojęcie trochę niefortunnie przetłumaczone przez Autora w polskim streszczeniu pracy jako „ułankowe polarne pole powierzchni”). Za pomocą skonstruowanego przez *P.Jankowskiego* modelu sprawdzono teoretyczną zdolność wycieku antybiotyków z wnętrza kropeł. Po odpowiednim wyznaczeniu grup antybiotyków zdolnych i niezdolnych do opuszczenia wnętrza kropli Doktorant sprawdził jakość zbudowanego modelu na 3 wybranych związkach przeciwbakteryjnych i uzyskał bardzo dobre wyniki. Następnie sprawdził czy na podstawie przynależności do poszczególnych klas można przewidzieć zdolność wycieku poszczególnych antybiotyków do fazy organicznej (wykres 31). Pan Ruszczak potwierdził także, że zarówno sposób przygotowania emulsji, jak również wyjściowe stężenia antybiotyków wewnątrz kropli (szczególnie tych, których zdolność wycieku jest wysoka) wpływa na efektywność tego procesu. **Niestety, podobnie jak w poprzednim rozdziale, tu także nie znalazłem typowej dla prac doktorskich, dyskusji z odniesieniami do prac innych zespołów badawczych**

pracujących z mikrosystemami kroplowymi, które wykorzystywane są w mikrobiologii. Mam nadzieję, że Doktorant w trakcie obrony szczegółowo odniesie się do tej uwagi, co na pewno ułatwi Komisji ocenę nowości naukowej pracy Autora.

Pracę kończy 3 stronicowe podsumowanie, w którym Pan Ruszczak przedstawił swoje najważniejsze osiągnięcia oraz pokazał możliwości wykorzystania udoskonalonych strategii i procedur do prowadzenia bardziej wiarygodnych badań mikrobiologicznych w systemach kroplowych generujących stabilne mikroemulsje woda-olej.

Cała praca, mimo niewielkiej objętości i dość odległych czasowo dwóch publikacji, które są jej podstawą (2016 i 2023r), jest zaskakująco dobrze skomponowana jako całość. Podczas jej lektury czytelnik nie odczuwa takiego długiego horyzontu czasowego i może odnieść wrażenie, że badania były zaplanowane chronologicznie w krótkim okresie – to **bardzo mocna strona tej pracy**. Spośród swojego bogatego dorobku publikacyjnego (10 artykułów) p. Ruszczak zgrabnie wybrał dwa, które pozwoliły mu sformułować dość niekonwencjonalny tytuł swojej rozprawy doktorskiej zaczynający się od słowa „udoskonalenie”. Muszę powiedzieć, że bardzo sceptycznie podchodziłem do lektury tej pracy, lecz mimo technicznych niedociągnięć i braku dyskusji wyników, co uważam za największą wadę tej pracy, bardzo pozytywnie się rozczarowałem.

Podsumowując stwierdzam, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pana Artura Ruszczaka, przedstawia wyniki badań opublikowane w czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF). 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 Dyscypliny Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Artura Ruszczaka do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.



Michał Chudy