

Prof. dr hab. Tadeusz PISARKIEWICZ
Akademia Górniczo-Hutnicza im. St. Staszica
al. Mickiewicza 30, 30-059 Kraków
profesor emerytowany

Kraków 10.08.2021

**KWESTIONARIUSZ – RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ
DLA RADY WYDZIAŁU ELEKTRONIKI MIKROSYSTEMÓW I FOTONIKI
POLITECHNIKI WROCŁAWSKIEJ**

Tytuł rozprawy:

***Cytometr odkształceniowy typu MEMS do badania deformowalności
oocytów zwierzęcych***

Autor rozprawy:

mgr inż. Aleksandra Pokrzywnicka

- 1. Jakie zagadnienie naukowe jest rozpatrzone w pracy i czy zostało ono dostatecznie jasno sformułowane przez autora? Jaki charakter ma rozprawa (teoretyczny, doświadczalny, inny)?**

Prezentowana rozprawa miała na celu opracowanie oryginalnej konstrukcji, technologii i metodologii badawczej mikrocytometru typu MEMS do badania komórek oocytów zwierzęcych. W efekcie nastąpiło połączenie rozwiązań mikrofluidycznych w zakresie sterowania przepływem komórki i mikromechanicznych do kontrolowanej deformacji oocytu, co było podstawą wieloparametrycznej oceny badanych oocytów z wykorzystaniem analizy obrazu deformowanego obiektu. Badania cytometrem wybranych właściwości mechanicznych mogą służyć do określenia stanu biologicznego komórki, co jest podstawą oceny jej dojrzałości, określenia cyklu życia a także oceny stanu chorobowego. Autorka rozprawy dokonuje szerokiego przeglądu dotychczasowych metod selekcji jakościowej oocytów zwierząt hodowlanych, ze szczególnym uwzględnieniem pomiarów mechanicznych właściwości komórek. Rozwiązanie oparte na urządzeniu MEMS jest alternatywą w stosunku do dotychczasowych eksperymentalnych metod badawczych a skala mikroinstrumentu jest dostosowana do wymiarów charakterystycznych badanych obiektów biologicznych.

Rozprawa doktorska ma zasadniczo charakter eksperymentalny. Opisana jest konstrukcja, technologia wytwarzania i zbadane właściwości komórek dla różnych konfiguracji cytometru. Prace technologiczne z obszaru mikromechaniki były możliwe dzięki bogatemu wyposażeniu laboratoriów Wydziału Elektroniki Mikrosystemów i Fotoniki PWr. Badania z wykorzystaniem utrwalonych oraz żywych oocytów świń prowadzone były pod nadzorem środowiska weterynaryjnego z Katedry Weterynarii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu w ramach współpracy w projekcie naukowym OPUS 10: „Mikrocytometria odkształceniowa komórek w zintegrowanym systemie miko-elektro-mechanicznym z aktywacją pneumatyczną i wieloparametryczną detekcją obrazową”.

2. Czy w rozprawie przeprowadzono w sposób właściwy analizę źródeł (w tym literatury światowej, stanu wiedzy i zastosowań w przemyśle) świadczącej o dostatecznej wiedzy autora. Czy wnioski z przeglądu źródeł sformułowano w sposób jasny i przekonujący?

W odwołaniach literaturowych autorka rozprawy przytacza aktualne źródła w ilości 147 pozycji, w tym własnych prac współautorskich 4 (wśród nich 1 znajdująca się na liście JCR). W trzech z tych prac występuje jako pierwszy współautor. Z ważniejszych cytowanych czasopism można wymienić (w nawiasach liczba odwołań oraz przypisana czasopismu punktacja wg. komunikatu MEN z 9 lutego 2021): *Lab on Chip* (12, 140 pkt), *Human Reprod.* (9, 140 pkt), *Sens. Actuators B* (6, 140), *Sci. Reports* (5, 140), *Biophys. J.* (4, 100 pkt), *Theriogenology* (4, 140 pkt), *J. Micromech. Microeng.* (3, 70), *Rev. Sci. Instrum.* (3, 70 pkt), *Micromachines* (3, 70 pkt), *Applied Physics Letters* (2, 100 pkt), *Analytical Chem* (2, 140 pkt), *Small* (2, 200 pkt), *Reproduction* (2, 100 pkt), *Sensors* (2, 100 pkt), *Nature Commun.* (1, 200 pkt), *Science* (1, 200 pkt), *Cytometry* (1, 100 pkt). Ranga wielu z wymienionych czasopism jest bardzo wysoka.

Biorąc pod uwagę szeroki zestaw wymienionych pozycji, istotnych dla tematyki rozprawy, należy stwierdzić, że autorka posiada bardzo dobre rozeznanie odnośnie aktualnego stanu wiedzy związanej z doktoratem. Wnioski z bogatego przeglądu źródeł zostały wykorzystane w realizacji pracy.

3. Czy autor rozwiązał postawione zagadnienia, czy użył właściwej do tego metody i czy przyjęte założenia są uzasadnione?

W wyniku szczegółowej analizy danych literaturowych zdefiniowane zostały założenia pracy związane z funkcjonalnością, projektem i technologią mikrocytometru. W pierwszym etapie pracy dokonano charakteryzacji elementów mikromechanicznych, mikrooptycznych i mikrofluidycznych wchodzących w skład cytometru. Układ mikroprzepływowy wytworzony został w szklanym podłożu, układ mikromechaniczny w podłożu krzemowym, komora pneumatyczna w dodatkowym podłożu szklanym. Wytworzone elementy zostały następnie trwale zintegrowane w procesie bondingu anodowego w jedną strukturę tworzącą mikrocytometr odkształceniowy, przy czym wytworzono trzy różne konfiguracje urządzenia. Tzw. konfiguracja A to mikrostruktura umożliwiająca pozycjonowanie komórki, membrana krzemowa pozwalająca na kontrolowane ściskanie oocyta oraz otwory doprowadzające do komory pomiarowej i ciśnieniowej. Konfiguracja B to dodatkowo zintegrowany światłowodowy czujnik ugięcia membrany krzemowej. W konfiguracji C górne podłoże szklane zawiera zintegrowane mikrostruktury optyczne umożliwiające wprowadzenie wiązki laserowej do komory pomiarowej i przeprowadzenie badań w trybie mikroskopii fluorescencyjnej. Badania deformowalności oocytów przeprowadzono z użyciem obu konfiguracji: A oraz B. Ze względu na brak dostępności materiału biologicznego badań z użyciem mikrocytometru w konfiguracji C nie przeprowadzono..

4. Na czym polega oryginalność rozprawy, co stanowi samodzielny i oryginalny dorobek autora, jaka jest pozycja rozprawy w stosunku do stanu wiedzy czy poziomu techniki reprezentowanych przez literaturę światową?

Dla układów eksperymentalnych opracowane zostały algorytmy sterowania pneumatycznego i fluidycznego, które wykorzystano w zestawie kontrolno-pomiarowym. Badania materiału biologicznego prowadzone były z zapewnieniem biokompatybilności i sterylności instrumentu. Zastosowanie technik mikroinżynierskich oraz obserwacji mikroskopowej umożliwiło badanie i parametryzację oocytów świń o średnicach z zakresu 110-150 μm . Obserwowano potencjalne uszkodzenia komórek podczas pomiarów oraz badano zmiany geometrycznych parametrów oocytów w wyniku ściskania. Określono różnice w deformowalności utrwalonych oraz żywych oocytów z różnych klas jakości, opracowano zależności pomiędzy parametrami deformowanych oocytów.

Wyniki badań były prezentowane na konferencjach krajowych i zagranicznych oraz zostały opublikowane w czasopiśmie naukowych. Jak stwierdza autorka we wnioskach końcowych, wyniki dokonanych badań są wartościowym wglądem w deformowalność oocytów i mogą być potraktowane jako wstęp do dalszych badań umożliwiających klasyfikację jakościową oocytów w oparciu o ich właściwości mechaniczne.

5. Czy autor wykazał umiejętność poprawnego i przekonującego przedstawienia uzyskanych przez siebie wyników (zwięzłość, jasność, poprawność redakcyjna rozprawy)?

Redakcja rozprawy nie nastęca trudności w zrozumieniu prezentowanej treści. Rysunki i zdjęcia są bardzo czytelne. Symbole występujące w nielicznych wzorach są objaśniane w treści albo zaznaczone na towarzyszących rysunkach. Akronimy używane są oszczędnie, a poza tym podany jest ich osobny spis na początku rozprawy.

Język rozprawy jest poprawny, błędy stylistyczne i językowe są nieliczne.

Przykłady: str. 53 dwa wiersze od góry „wartością naprężenia dla krzemu to...”

str. 63, trzeci wiersz od dołu, użycie terminu „waga” zamiast „masa”,

str. 85, wiersz piąty od góry, „ciśnienia sterującego na membranę”.

Nieprecyzyjnych wyrażen tego typu jest jednak bardzo niewiele.

6. Jakie są słabe strony rozprawy i jej główne wady?

Nie zauważono błędów rzeczowych w treści rozprawy i wskazać można jedynie na pewne nieścisłości lub braki objaśnień wpływających na poprawne zrozumienie.

W rozdz. 4.2 podano, że przy badaniu odkształceń komórek można obserwować wzrost wymiarów komórki pod wpływem ściskania. Trudno jest zrozumieć jak to jest możliwe podczas ściskania (Tab.4.1, Rys.4.1). Tego rodzaju wyniki obserwacji wydają się mało oczywiste i wymagają komentarza.

Obserwowane zmiany średnicy %Hout przykładowo na Rys.4.2, nie pozostają w zgodności z oznaczeniami wprowadzonymi na Rys.3.59, gdzie %Hout powinno dawać wyniki rzędu 100%.

Jak określano „stopień ściśnięcia”. Przykładowo podpis pod Rys.4.9 utożsamia to z ciśnieniem, a Rys.4.5 sugeruje, że o taką wartość zmieniała się średnica Hout.

Ogólnie usterki te biorą się przeważnie stąd, że moment pomiaru nie zawsze określony jest precyzyjnie. Wymienione uwagi nie wpływają jednak na wysoką ocenę redakcji całej rozprawy.

7. Do której z następujących kategorii Recenzent zalicza rozprawę:

- a) nie spełniająca wymagań stawianych rozprawom doktorskim przez obowiązujące przepisy
- b) wymagająca wprowadzenia poprawek i ponownego recenzowania
- c) spełniająca wymagania
- d) spełniająca wymagania z wyraźnym nadmiarem
- e) wybitnie dobra, zasługująca na wyróżnienie

Praca zdaniem recenzenta **spełnia wymagania** wynikające z ustawy o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki z 14 marca 2003 r (Dz. U. Nr 65, poz. 95 z późniejszymi zmianami). Osiągnięcia naukowe doktorantki mieszczą się w zakresie dyscypliny automatyka, elektronika i elektrotechnika, dziedzina nauki inżyniersko-techniczne. Wnioskuje zatem o dopuszczenie **mgr inż. Aleksandry Pokrzywnickiej** do publicznej obrony.



Prof. dr hab. Tadeusz Pisarkiewicz