

Dr hab. inż. **Dorota G. Pijanowska**, Prof. IBIB PAN
Instytut Biocybernetyki i Inżynierii Biomedycznej im. M. Nałęczza PAN
ul. Księcia Trojdena 4, 02-109 Warszawa
Tel.: +48 22 659 9143 w. 141
Faks: +48 22 659 7030
E-mail: dpijanowska@ibib.waw.pl

Warszawa, 20 października 2016r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Tytuł rozprawy: „Zastosowania holograficznej pęsety optycznej do pomiarów wybranych właściwości preparatów biologicznych i koloidów”

Doktorant: mgr inż. Marcin Bacia

Promotorzy rozprawy: dr hab. Jan Masajda, prof. PWr
 dr hab. Marta Kopaczyńska, prof. PWr

Mgr inż. Marcin Bacia ukończył studia magisterskie na Wydziale Podstawowych Problemów Techniki Politechniki Wrocławskiej. Na tym samym Wydziale ukończył studia III stopnia – interdyscyplinarne studia doktoranckie z zakresu bioinżynierii, jednocześnie realizując badania związane z rozprawą doktorską w Laboratorium Manipulatorów Optycznych i Katedrze Inżynierii Biomedycznej. Studia odbywały się w ramach projektu „Młoda Kadra 2015 Plus” finansowanego z środków Europejskiego Funduszu Społecznego.

TEMATYKA PRACY

Rozwój nowoczesnych kierunków naukowo-badawczych, w tym badań nad mikroukładami pomiarowymi (narzędziami) do oznaczeń analitycznych różnych substancji czy też do badań na poziomie komórkowym i molekularnym jest związany m.in. z rozwojem zaawansowanych technologii, a w szczególności technologii krzemowej, służących do wytwarzania zintegrowanych struktur pomiarowych typu mikroukład opto-elektromechaniczny – MOEMS (ang. *micro-opto-electro-mechanical system*).

Recenzowana rozprawa doktorska wpisuje się w ten zakres badań i dotyczy konstrukcji i wykorzystania układu pęsety optycznej (inaczej szczypiec optycznych

- OT ang. *optical tweezers*) do badań dwóch rodzajów obiektów: (1) biocząsteczek i komórek - próbki biologiczne oraz (2) nanocząsteczek w roztworach koloidalnych. Badania prowadzone w ramach rozprawy, dotyczące wykorzystania mikromanipulatorów optycznych, są interdyscyplinarne i były prowadzone w dwóch zespołach: dr hab. inż. Jana Masajdy z Laboratorium Manipulatorów Optycznych i dr hab. Martę Kopaczyńską z Katedry Inżynierii Biomedycznej, którzy są promotorami niniejszej rozprawy. W szczególności Doktorant zajął się badaniami nad zastosowaniem holograficznej pęsety optycznej - HOT (ang. *holographic optical tweezers*) w badaniach preparatów biologicznych oraz w roztworach koloidalnych.

STRUKTURA I ZAWARTOŚĆ ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Przedłożona rozprawa doktorska zawiera 117 stron, obejmujących 8 rozdziałów, 125 rysunków. Elementy pracy są logicznie powiązane, a ich umieszczenie w tekście pracy jest uzasadnione. Rozprawa jest w postaci tradycyjnej monografii, w której po krótkim jednostronicowym wstępie (rozdział 1) przedstawiono kolejno wprowadzenie stanowiące przegląd literatury (rozdział 2), cel i tezy pracy (rozdział 3), opis części eksperymentalnej wraz z wynikami (rozdziały 4-6), wnioski końcowe i podsumowanie (rozdział 7 i 8) oraz bibliografię, stanowiącą nienumerowany rozdział 9., na którą składa się z 96 pozycji literaturowych. Rozprawa zawiera również wymagane streszczenie w języku angielskim.

W rozdziale 2., Doktorant omawia zasadę działania pęset optycznych, w tym holograficznych oraz przedstawia pęsety optyczne będące na wyposażeniu Laboratorium Manipulatorów Optycznych WPPT PWr. W rozdziale 4, została przedstawiona stosowana metodyka badań, włączając również zarys podstaw układowych i teoretycznych, w zakresie niezbędnym do opisu optymalizacji układu pęsety optycznej.

W kolejnych rozdziałach 5 i 6 zostały przedstawione przykłady zastosowania HOT w różnego rodzaju badaniach: (1) struktur komórkowych, w tym właściwości mechanicznych cząsteczek DNA i zmian tych właściwości pod wpływem substancji interkalującej w postaci leku przeciwnowotworowego – doksorubicyny (DOX), jak również właściwości komórek macierzystych ostrej białaczki szpikowej (AML, ang. *acute myeloid leukemia*) w formie natywnej i po zastosowaniu leku DOX oraz (2) cieczy paramagnetycznych.

W przypadku holograficznej pęsety optycznej, dzięki zastosowaniu ciekłokrystalicznego modulatora światła (SLM, ang. *spatial light modulator*), można uzyskać większą liczbę pułapek optycznych. Sprawdzono możliwość wykorzystania modulatora odbiciowego, który ma większą wydajność dyfrakcyjną w stosunku do częściej stosowanych modulatorów

transmisyjnych. Jednakże jakość powierzchni tych modulatorów nie jest wystarczająco dobra i wymaga stosowania korekcji. Odpowiednie mapy korekcyjne zostały wykonane w różnych ustawieniach kątowych modulatora, a następnie powstały algorytm został zaimplementowany w środowisku MATLAB.

Należy podkreślić wysoki stopień trudności prowadzonych eksperymentów z wykorzystaniem struktur biologicznych. Na etapie przygotowania pomiaru wymagały wielu powtórzeń i w dużej mierze intuicyjnego podejścia, np. odnosi się to do doboru parametrów i sposobu przygotowania próbek, m.in.: czas kontaktu kulek znajdujących się w pułapkach optycznych w celu przyłączenia pojedynczej cząsteczki DNA, metoda modyfikacji polistyrenowych kulek – utworzenie warstwy streptawidyny. Innym elementem układu, który należy dostosować do specyfiki badanych obiektów jest komora pomiarowa, zaproponowane komory pomiarowe umożliwiają badania w polu elektrycznym lub magnetycznym i procedury przygotowania preparatów do badań. Wspomniana wcześniej metodyka użyta do osiągnięcia ww. celu jest poprawna, przeprowadzono wiele różnych doświadczeń, które wymagały odpowiednich przygotowań m.in. różnorodnych preparatów do badań.

Oryginalną część rozprawy stanowią badania w roztworach koloidalnych paramagnetyków (ferrofluidach) opartych na nanocząsteczkach magnetytu z wykorzystaniem holograficznej pęsety optycznej, która umożliwiła generowanie niezależnych pułapek optycznych, i do układu której wprowadzono możliwość generowania pola magnetycznego. Uzyskane bardzo istotne wyniki tych badań w postaci obserwacji wielokątnych wirów w mikroskali, zostały opublikowane w czasopiśmie *OPTICS LETTERS*. Wykazano, że możliwa jest zmiana trajektorii wirujących nanocząsteczek magnetycznych w zawiesinie i liczby ramion wiązki wiru optycznego w zależności od natężenia pola magnetycznego.

Rozprawa jest bardzo bogato ilustrowana i starannie zredagowana, jednakże pojawiają się drobne nieścisłości jak również niejasności, które przedstawię w uwagach krytycznych i kilku uwagach edytorskich.

UWAGI KRYTYCZNE

1. W rozprawie zostały sformułowane dwie tezy ujmujące w ogólny sposób możliwość wykorzystania holograficznej pęsety optycznej do: (1) ilościowych pomiarów sił mechanicznych w preparatach biologicznych i (2) badań nad właściwościami fizycznymi koloidów. Natomiast jako cel rozprawy postawiono zbudowanie działającego układu HOT umożliwiającego „*prowadzenie zaawansowanych pomiarów biologicznych i fizycznych*”.

Należy zwrócić uwagę, że treść tez i celu nie są tożsame, albowiem w tezach nie są wspomniane pomiary biologiczne a jedynie preparaty biologiczne.

2. Podjęte badania, mające charakter użytkowy, nad wykorzystaniem HOT powinny być wyraźnie powiązane z dokonany przeglądem literatury przedmiotu. Jednakże, w rozprawie stosunkowo mało rozbudowany jest przegląd literatury. Wprowadzenie nie zawiera istotnych publikacji Arthura Ashkina, który przedstawiał we wczesnych swoich publikacjach z lat 70. i 80. ubiegłego wieku, wyniki badań nad optycznym pułapkowaniem cząstek za pomocą promieniowania oraz pułapkowaniem i manipulacją pojedynczymi komórkami, np.:
 - a) A. Ashkin: Acceleration and trapping of particles by radiation pressure, Phys. Rev. Lett. 24:156-159 (1970)
 - b) A. Ashkin: Applications of laser radiation pressure, Science 210:1081-8 (1980)
 - c) A. Ashkin, J.M. Dziedzic, T. Yamane: Optical Trapping and Manipulation of Single Cells Using Infrared Laser Beams, Nature 330:769-771 (1987)
 - d) A. Ashkin, J.M. Dziedzic: Optical Trapping and Manipulation of Viruses and Bacteria, Science 235:1517-1520 (1987)

Cytowane w rozprawie dwie prace Ashkina (poz. 1 i 27) nie są reprezentatywne dla tej tematyki.

3. W miejscu omawiania mechanizmu, zasady działania pęsety optycznej na rysunkach 2.1.1.1 i 2.1.1.2 powinny być uzupełnione wektory pędu, które są wspomniane w opisie na str. 3.
4. W rozprawie dobrze byłoby rozszerzyć opis metody eliminacji szumów tła.
5. W przypadku analiz obrazów użytych do badania przezroczystości wnętrza pęcherzyków (rysunki str. 82 i 83) zostały wybrane obszary – fragmenty obrazów, które były ze sobą porównywane (wnętrze pęcherzyka i próbka zawierająca wodę). Nie zostały podane kryteria wyboru tych obszarów w obrębie jednego obrazu (np. rysunek 6.1.2.2.8 d-l).
6. Dobrym podsumowaniem rozprawy byłoby przedstawienie ograniczeń metody w odniesieniu do badanych próbek/preparatów i powstałego układu pomiarowego.
7. Pojawia się również pytanie do dyskusji - czy była rozważana możliwość prowadzenia takich badań w układach mikroprzepływowych?

Uwagi redakcyjne

1. W spisie treści nie został zamieszczony rozdział 6.
2. W zapisie liczb mianowanych należy stosować odstęp między liczbami i jednostkami - dotyczy całej rozprawy.

3. Zgodnie z polską terminologią naukową powinien być stosowany termin „*natężenie promieniowania*” zamiast używanego w rozprawie „*intensywność wiązki*” – będący kalką z języka angielskiego, (str. 2, 3 i inne).
4. W rozprawie używane jest mylące sformułowanie - elastyczność pęsety holograficznej (str. 111), które jest rozumiane jako „*łatwość wprowadzania zmian w generowanych pułapkach optycznych*”. W tym przypadku powinno używać się określenia takiego jak funkcjonalność.
5. W rozprawie zostały rozdzielnie użyte terminy właściwości mechaniczne i sprężyste (str. 109 i 110), przy czym należy pamiętać, że właściwości sprężyste należą do grupy właściwości mechanicznych.
6. Lepiej jest stosować sformułowanie „*dzięki temu*” zamiast „*dzięki czemu*” (str. 82).

Podsumowując, recenzowana rozprawa, o charakterze konstrukcyjno-doświadczalnym, jest bardzo rzetelnym opracowaniem, świadczącym o zaangażowaniu Doktoranta w planowanie, przygotowanie narzędzi i wykonanie czasochłonnych badań. Bardzo ważnym faktem jest to, iż Doktorant dobrze udokumentował uzyskane wyniki, w rozprawie zostały przedstawione liczne dobrej jakości fotografie i rysunki.

Należy stwierdzić również, że cel pracy został właściwie sformułowany. Istotnymi wynikami przedstawionymi w rozprawie są: (1) opracowanie procedury optymalizacji układu holograficznej pęsety optycznej, uwzględniając kryterium maksymalizacji chwytu pułapki (przyjęto, że o jakości układu świadczy - sztywność pułapki określana na podstawie drgań kulki PS w pułapce) oraz (2) pozytywna weryfikacja możliwości wykorzystania opracowanego układu holograficznej pęsety optycznej do prowadzenia badań w różnego typu preparatach biologicznych i ferrofluidach, m.in. oceny właściwości mechanicznych DNA i interkalowanego DNA oraz komórek blastycznych ostrej białaczki szpikowej przed i po zastosowaniu doksorubicyny.

DOROBEK NAUKOWY DOKTORANTA

Dodatkowo wspomnę o dorobku publikacyjnym Doktoranta, który jest dobry. Doktorant jest współautorem 3 artykułów w czasopismach z bazy Journal Citation Report (JCR, tworzonej w Institute for Scientific Information - ISI, Philadelphia, USA), w tym: *OPTICS AND LASERS IN ENGINEERING* (1 art., $IF^{2015} = 2,319$), *OPTICS LETTERS* (1 art., $IF^{2015}: 3,04$) i *OPTICA APPLICATA* (1 art., $IF^{2015}: 0,637$) – w tym artykule występuje jako

1-szy autor oraz *Proceedings of SPIE* (2 art.) – uwzględnionego w bazie *Web of Science*. Sumaryczny i średni współczynnik wpływu czasopism wynoszą odpowiednio 5,996 i 1,999. Ponadto jest współautorem 2 w czasopismach *Photonics Letters of Poland* i *Acta bio-Optica et Informatica Medica. Inż. Biomed.* Łączna liczba punktów przyznawanych za publikacje w ww. czasopismach z listy A i B MNiSW wynosi 119.

WNIOSEK KOŃCOWY

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr inż. Marcina Baci spełnia warunki stawiane rozprawom doktorskim przez Ustawę o stopniach naukowych i tytule naukowym w zakresie sztuki z dn. 14 marca 2003 roku wraz z późniejszymi poprawkami podanymi w Ustawie „*Prawo o szkolnictwie wyższym*”. Tematyka ocenianej rozprawy o charakterze konstrukcyjno-doświadczalnym mieści się w dyscyplinie biocybernetyka i inżynieria biomedyczna. Ponadto Doktorant ma również dobry dorobek publikacyjny.

Zatem wnoszę o dopuszczenie Doktoranta do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Jednocześnie ze względu na staranny sposób przygotowania rozprawy – poprawność formalną i redakcyjną, wysoki poziom trudności prac eksperymentalnych przeprowadzonych w ramach rozprawy oraz oryginalny wynik dotyczący badań w roztworach koloidalnych paramagnetyków (ferrofluidach), wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr inż. Marcina Baci.

