



Dr hab. inż., prof. uczelni Elżbieta Jastrzębska  
Wydział Chemiczny  
Politechnika Warszawska  
Ul. Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa  
[elzbieta.jastrzebska@pw.edu.pl](mailto:elzbieta.jastrzebska@pw.edu.pl)

Warszawa, 14 Marca 2025

### RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr **Tetuko Kurniawan**

pt. **“Wytwarzanie kropeł w mikroprzepływowych złączach krzyżowych:  
mechanizmy i zastosowania jako inkubatory komórkowe”**

wykonanej w Instytucie Podstawowych Problemów Techniki PAN  
w Zakładzie Biosystemów i Miękkiej Materii

**Promotor:** Dr hab. Piotr M. Korczyk

**Promotor pomocniczy:** Dr inż. Sławomir Błoński

Przedstawiona mi do recenzji rozprawa doktorska obejmuje szeroko pojętą tematykę mikroprzepływowych technik generowania kropeł i ich zastosowania w badaniach komórkowych. W ostatnich latach nastąpił gwałtowny rozwój systemów mikroprzepływowych zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Mikroukłady przepływowe do tworzenia kropeł są jednym z podejść mikrotechnologii mogących znaleźć zastosowanie w badaniach biomedycznych. W ostatnich latach wykorzystano je między innymi jako wysokoprzepustowe techniki do badania pojedynczych komórek, dostarczania leków czy hodowli komórkowych. Niemniej jednak nadal jest wiele aspektów, które wymagają głębszego zbadania. Celem przedłożonej mi pracy doktorskiej było zbadanie formowania się kropeł w mikroprzepływowych złączach krzyżowych przy bardzo niskiej liczbie kapilarnej (Ca), gdzie napięcie powierzchniowe dominuje nad oddziaływaniami lepкими. Ponadto, doktorant

Politechnika  
Warszawska

ul. Noakowskiego 3  
00-664 Warszawa  
[www.ch.pw.edu.pl](http://www.ch.pw.edu.pl)

badał potencjalne zastosowania opracowanych mikroukładów do manipulacji komórek. Bez wątpienia tematyka pracy doktorskiej jest istotna w kontekście przyszłego zastosowania systemów mikroprzepływowych w badaniach biologicznych oraz diagnostyce biomedycznej.

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska składa się z pięciu rozdziałów: Wstępu, Przeglądu literatury, Materiałów i metod, Wyników i dyskusji oraz Wniosków. Dodatkowo, rozprawa doktorska obejmuje Streszczenie, Wykaz publikacji, Finansowanie, Spis treści, Wykaz rycin, Wykaz tabel, Nomenklaturę oraz Bibliografię. Cała rozprawa doktorska (z wyłączeniem Streszczenia, Wykaz publikacji, Finansowanie, Spisu treści, Wykaz rycin i tabel oraz Nomenklatury) liczy 100 stron. Praca została napisana w języku angielskim i dodatkowo została wzbogacona o wykresy, schematy, zdjęcia i równania. Od strony edytorskiej pracę oceniam dobrze. Popołniono kilka błędów edytorskich, których jest nie sposób uniknąć w tego typu pracach i nie umniejszają wysokiej oceny niniejszej rozprawy doktorskiej.

Pierwszą częścią rozprawy doktorskiej jest Wstęp. Obejmuje on 8 stron. Rozdział ten krótko wprowadza w tematykę mikrotechnologii, podkreśla motywację do podjęcia badań oraz wskazuje cel i hipotezę niniejszej rozprawy. Na końcu tego rozdziału Doktorant umieścił krótki konspekt rozprawy wraz z opisem poszczególnych rozdziałów. W moim przekonaniu podrozdział 1.6 powinien być umieszczony na początku rozdziału pierwszego. Uważam za niezasadne opisywanie tego, co będzie się znajdowało w rozdziale 1, po jego przeczytaniu. Dodatkowo, cel i hipotezy pracy zwykle są przedstawiane po przeglądzie literatury. Niemniej jednak, Doktorant w pierwszym rozdziale uzasadnia motywację do podjęcia badań będących przedmiotem doktoratu, co w zasadzie może prowadzić do postawienia celu pracy. W kolejnym rozdziale doktorant przedstawia Przegląd literatury, w którym omówione są podstawowe zagadnienia dotyczące mikrofluidyki (mechanika przepływów jednofazowego i dwufazowego), metod formowania kropeł w mikroprzepływowych układach oraz zagadnienia dotyczące modeli teoretycznych. Ostatnia część tego rozdziału dotyczy wykorzystania kropeł do hodowli i inkubacji komórek oraz mechanizmu transportu masy przez poli(dimetylosiloksan) (PDMS). Przedstawiony przegląd literatury stanowi dobre wprowadzenie do tematyki rozprawy doktorskiej. Niemniej jednak to, czego najbardziej brakowało mi w tej części, to wskazanie i omówienie najistotniejszych osiągnięć (kamieni milowych) różnych grup badawczych, dotyczących wykorzystania kropeł do hodowli i analizy komórek. Należy zauważyć, że warunki hodowli mają ogromny wpływ na ostateczne wyniki badań komórkowych w mikrosystemach, dlatego też omówienie tego wydaje się zasadne. Zabrakło również krótkiego podsumowania części literaturowej pracy.



Doktorant postawił hipotezę „... że tworzenie się kropli w mikroprzepływowym złączu krzyżowym przy bardzo niskiej liczbie kapilarnej jest znacząco od niej zależne i różni się znacznie od mechanizmu obserwowanego w złączach typu T”. W celu potwierdzenia tej hipotezy, doktorant opracował różne systemy mikroprzepływowe i badał tworzenie się w nich kropeł dla różnych geometrii oraz prędkości przepływu. Dodatkowo, opracował modele matematyczne przepływów. Kolejnym celem pracy było zbadanie możliwości zastosowania kropeł w mikroprzepływowych złączach krzyżowych jako inkubatorów komórkowych. Nie została jednak przedstawiona żadna hipoteza badawcza w tym zakresie.

Kolejna część rozprawy doktorskiej to Materiał i metody. Obejmuje ona 25 stron i jest podzielona na pięć podrozdziałów: Wytwarzanie mikrosystemów z wykorzystaniem metody frezowania, Miękka litografia, Układ eksperymentalny do tworzenia kropli, Układ eksperymentalny do tworzenia kropeł w mikroukładach i zastosowania ich jako inkubatorów komórkowych oraz Metodyka pomiarowa. W pierwszych dwóch podrozdziałach opisano szczegółowo wytwarzanie układów przy użyciu metody frezowania oraz techniki miękkiej litografii, która została bardzo szeroko przedyskutowana. Jednocześnie brakuje jednoznacznie przedstawionej techniki wytwarzania poszczególnych elementów oraz finalnie opracowanych mikrosystemów (jaką metodą, jakie parametry dla danej metody). Ostatecznie doktorant opracował sześć urządzeń o różnych geometriach i przetestował generowanie w nich kropeł dla różnych prędkości przepływu. W tej części zostały przedstawione metody pomiaru tworzenia kropli (oparte na analizie obrazu). Dodatkowo, zostały omówione różne podejścia wprowadzania komórek oraz metody wytwarzania mikrosystemów z różnych materiałów, tak aby zapobiec parowaniu kropeł.

W oparciu o część eksperymentalną, można stwierdzić, że **Doktorant jest zaznajomiony z technikami z różnych dziedzin, tj. mikrotechnologia, materiały, biologia, co potwierdza interdyscyplinarny charakter prowadzonych badań.** Doktorant przedstawił w tej części pracy również wiele wyników swoich prac, np. zdjęcia mikrosystemów opatrzone komentarzami. Z punktu widzenia recenzenta, powinno to być elementem kolejnej części pracy, a nie części eksperymentalnej. Z kolei, zabrakło kilku istotnych informacji dotyczących metodyki pracy: np. spis materiałów, odczynników i aparatury, analiza statystyczna, metodyka pracy z komórkami (typ zastosowanych komórek, sposób ich hodowli i przygotowania do badań w mikrosystemie, znakowanie i analiza).

Kolejny rozdział przedstawia wyniki uzyskanych badań i obejmuje on 37 stron. W tym rozdziale, opisano wzorce przepływu w mikroprzepływowych połączeniach krzyżowych dla



różnych wartości przepływu. W trakcie pracy Doktorant dokonał obserwacji, że obok już znanych metod tworzenia kropli z ang. “*at junction*”, “*downstream*”, “*parallel flow*” możliwe jest uzyskanie bimodalnej pracy układu generującego krople. W badaniu formowania się kropli dla niskich wartości liczby kapilarnej ( $Ca$ ) dla różnych przepływów zaobserwowano zasadniczą różnicę w tworzeniu się kropli w połączeniach krzyżowych i złączach T. Zaobserwowano, że w połączeniach krzyżowych szyjka formującej się kropli może znacznie się wydłużyć przed jej oderwaniem i jest to silnie zależne od wartości liczby kapilarnej ( $Ca$ ). Ponadto, wydłużenie to znacząco wpływa na końcową objętość kropli w reżimie niskich wartości  $Ca$ . **Nie mam wątpliwości, że przedłożona praca posiada oryginalne badania, wnoszące nową wiedzę w zakresie mikrotechnologii.** Doktorant, opracował również modele matematyczne przepływów, w celu wyjaśnienia zaobserwowanych zjawisk, zależności pomiędzy wydłużaniem się kropli a wartością liczby kapilarnej ( $Ca$ ). Uzyskane wyniki badań potwierdzają przyjętą hipotezę pracy. Wyniki powyższych badań zostały opublikowane w czasopiśmie *Chemical Engineering Journal* (**IF=15.1**). Należy podkreślić, że Doktorant jest pierwszym oraz korespondencyjnym autorem tej pracy.

Kolejna część pracy dotyczy zastosowania kropeł w układach mikroprzepływowych do manipulacji komórek. Zaproponowana przez Doktoranta metodyka wprowadzania komórek do mikrosystemu oraz tworzenia się kropeł zapobiegała tworzeniu się agregatów komórkowych i zapewniała rozkład komórek wg rozkładu Poissona. Doktorant badał również parowanie cieczy w mikroukładach wykonanych z różnych materiałów. Jest to bardzo ważny parametr związany z hodowlą komórek w mikroukładach, wpływający m.in. na żywotność komórek, który niestety wielokrotnie pomijany jest w badaniach prowadzonych w mikroukładach do hodowli komórek. Zaobserwowano, że w trakcie 3 h hodowli krople odparowują z mikroukładu wykonanego z PDMS i szkła. W związku z czym, Doktorant wykonał mikroukłady PDMS-szkło ze zbiornikiem wodnym na górnej warstwie układu, PDMS-szkło z nieprzepuszczalnym materiałem i dodatkowym kanałem bocznym, szkło-szkło i analizował w nich parowanie wytworzonych kropeł. Doktorant potwierdził, że zastosowanie mikroukładów: PDMS-szkło z nieprzepuszczalnym materiałem i dodatkowym kanałem bocznym oraz szkło-szkło zapobiega parowaniu kropeł. Należy pamiętać o tym, że takie rozwiązanie może zmniejszyć przepuszczalność tlenu do wnętrza mikroukładu i tym samym zmniejszać żywotność komórek. Doktorant, wspomina o tym aspekcie, niemniej jednak głębsza dyskusja i badania w tym zakresie mogły być przedstawione.



Doktorant przeprowadził badania żywotności komórek wewnątrz wytworzonych kropeł, co miało potwierdzić możliwość zastosowania opracowanych mikroukładów w badaniach biologicznych. W dokumentacji wskazano, że badania te były wykonywane we współpracy z Prof. Tomaszem Lipnickim, więc zakładam, że badania te nie były głównym obszarem pracy Doktoranta. Niemniej jednak w tej części brakuje dodatkowych informacji wyników dotyczących przeprowadzonych badań (np. przygotowanie, wybarwienie i analiza komórek). Wywnioskowano, jednak wyłącznie na podstawie zdjęć, że komórki wykazywały wysoką żywotność w mikroukładach przez 24 h. Pytanie brzmi, czy w prowadzonej hodowli można było również zaobserwować komórki nekrotyczne? Pomimo tych uwag należy podkreślić, że Doktorant przeanalizował i uwzględnił kluczowy aspekt, jakim jest badanie parowania w mikroukładach do hodowli komórek. W moim przekonaniu, w celu wyciągnięcia wniosków dotyczących aspektów komórkowych, ta część pracy może być szeroko rozwinięta, co wymaga przeprowadzenia dalszych testów biologicznych. Ostatnia część pracy to Wnioski. Wyniki badań zostały omówione w poszczególnych rozdziałach, niemniej jednak pominięto typową dyskusję uzyskanych wyników. Proszę o skomentowanie wyników uzyskanych w niniejszej dysertacji w porównaniu z najnowszą literaturą naukową.

Na szczególną uwagę zasługuje interdyscyplinarność prowadzonych badań. Doktorant musiał nauczyć się różnych technik z pogranicza różnych dziedzin nauki: była to nie tylko mikrotechnologia, biologia, ale również część związane z opracowaniem modelu matematycznego. Nie ulega wątpliwości, że Doktorant wprowadził nową wiedzę w dziedzinie mikrotechnologii i osiągnął założony cel pracy.

W trakcie publicznej obrony proszę Doktoranta o odniesienie się do powyższych uwag. Ponadto, dołączam kilka dodatkowych komentarzy i sugestii.

- Proszę skomentować czy możliwe jest prowadzenie hodowli i analizy długoterminowej komórek w kroplach wytwarzanych w mikroukładach? Jakie są wady i zalety zastosowania tego typu mikroukładów w porównaniu z innymi metodami hodowli komórek w mikroskali?
- Mam wątpliwość czy można nazwać opracowane mikroukłady i metodę hodowli komórek w kropli inkubatorami, jeśli zostały one użyte do hodowli wyłącznie przez 24h.
- Proszę skomentować badania dotyczące parowania cieczy w mikrosystemie szło-szło (Doktorant nie przedstawił wykresu z przeprowadzonych badań).



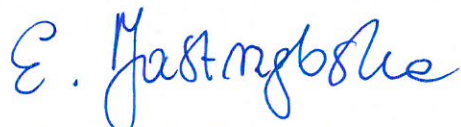
- Proszę wyjaśnić eksperymenty prowadzone z komórkami (w jakim typie mikroukładu prowadzono badania, jakie komórki zastosowano, sposób przygotowania komórek do hodowli, metodyka analizy, itp.). Tak jak wspomniano wcześniej w recenzji, brakuje opisu metodyki prac prowadzonych w mikroukładach z hodowlą komórek.
- Brakuje spisu stosowanych materiałów, aparatury i reagentów.
- Brakuje analizy statystycznej.

### **Wniosek końcowy**

Biorąc pod uwagę wartość merytoryczną rozprawy doktorskiej Pana mgr Tetuko Kurniawan **stwierdzam, że oceniana praca doktorska spełnia kryteria stawiane kandydatom ubiegającym się o stopień naukowy doktora określone w Ustawie z dnia 20 lipca 2018 roku Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. 2024 poz. 1571)**. Zgodnie z zapisem Ustawy Art. 187. Pkt 1. "Rozprawa doktorska prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną kandydata w dyscyplinie oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej" oraz pkt. 2. "Przedmiotem rozprawy doktorskiej jest oryginalne rozwiązanie problemu naukowego, oryginalne rozwiązanie w zakresie zastosowania wyników własnych badań naukowych w sferze gospodarczej lub społecznej albo oryginalne dokonanie artystyczne." Na podkreślenie zasługuje bardzo dobra znajomość Doktoranta szerokiego wachlarza nowoczesnych metod badawczych oraz umiejętność ich wykorzystania. Doktorant wykazał, że w połączeniach krzyżowych szyjka formującej się kropli może się wydłużać przed jej oderwaniem i jest to zależne od liczby kapilarnej (Ca). Doktorant opracował również matematyczne modele przepływów w celu wyjaśnienia obserwowanych zjawisk i wykazał, że opracowane rozwiązanie może być wykorzystywane do hodowli komórek przez 24 godziny. Pomimo uwag wskazanych w powyższej recenzji, uzyskane wyniki wnoszą istotny wkład w wiedzę z zakresu mikroprzepływów i mikrotechnologii. Opracowane rozwiązanie technologiczne może być istotne w dalszych zastosowaniach biologicznych. Należy podkreślić, że dorobek naukowy doktoranta jest bardzo dobry: współautorstwo 6 prac (1 związana z niniejszą rozprawą o wysokim współczynniku IF - 15,1) opublikowanych w czasopiśmie z listy JCR, 5 publikacji nieindeksowanych, 5 konferencji związanych z rozprawą doktorską oraz udział w grantach. Kolejny manuskrypt jest w przygotowaniu. W związku z przedstawioną wyżej bardzo pozytywną oceną całej pracy doktorskiej **wnioskuję do Rady Dyscypliny Inżynieria Mechaniczna Instytutu Podstawowych Problemów Techniki PAN o dopuszczenie mgr**

**Tetuko Kurniawan do dalszych etapów przewodu doktorskiego oraz pragnę  
rekomendować niniejszą rozprawę do wyróżnienia.**

Recenzent



Prof. dr hab. inż. Elzbieta Jastrzebska