

Magdalena Anna Czekalska

Promotor: Prof. Piotr Garstecki

Mikroprzepływowe dwufazowe układy do tworzenia i badania dwuwarstw lipidowych

Tworzenie modelowych dwuwarstw lipidowych w warunkach *in vitro* jest kluczowe w prowadzeniu badań nad elementarnymi właściwościami błon biologicznych i białek błonowych. Jednym ze sposobów, który pozwala na uzyskanie stabilnej membrany jest zanurzenie wodnych kropeł w oleju zawierającym lipid, a następnie, po utworzeniu monowarstwy lipidowej na powierzchni każdej z kropeł, ich zetknięcie. W miejscu zetknięcia się powierzchni dwóch kropli, tworzy się dwuwarstwa lipidowa na styku kropeł (ang. *droplet interface bilayer*, DIB). Układ ten, w porównaniu do innych fizycznych modeli dwuwarstw lipidowych, cechuje się wyjątkową stabilnością mechaniczną. Dodatkowo krople są zamkniętymi mikroreaktorami, umożliwiając stosunkowo łatwą kontrolę nad warunkami chemicznymi po każdej z dwóch stron błony lipidowej niezależnie.

Bardzo korzystną strategią tworzenia kropeł jest zastosowanie układów mikroprzepływowych – technologii, która jest dynamicznie rozwijana w ciągu ostatnich 25 lat. Miniaturyzacja systemów pozwalających na wysokoprzepustowe prowadzenie badań biologicznych i chemicznych w bardzo małych objętościach płynów, jest możliwa dzięki opracowaniu metod mikroprzepływowych operacji na kroplach o objętości pomiędzy femto- a mikrolitrami.

Projekty badawcze, których wyniki opisuje ta rozprawa doktorska, skupione były na – w wielu aspektach pionierskim – zastosowaniu technik mikroprzepływowych do tworzenia dwuwarstw lipidowych oraz prowadzenia na tych modelowych układach eksperymentów. Celem badań było synergistyczne połączenie zalet prowadzenia badań za pomocą technik mikroprzepływów dwufazowych z unikalnymi właściwościami metody DIB. W projektach uwzględniono zarówno aspekt badań podstawowych, jak i praktyczne zastosowanie prowadzonych prac.

Rozprawa podzielona jest na 7 rozdziałów. W rozdziale 1 zawarty jest przegląd literatury na temat dostępnych metod tworzenia modelowych dwuwarstw lipidowych, ze szczególnym uwzględnieniem wykorzystania technik mikroprzepływowych. Rozdział 2 przedstawia materiały i metody użyte w pracach badawczych. Wyniki zaprezentowane są w rozdziałach 3 – 6 pod kątem podziału na następujące projekty.

Rozdział 3 przedstawia zautomatyzowany system do cyklicznego tworzenia dwuwarstw lipidowych i badania aktywności kanałów białkowych. W prezentowanym układzie mikroprzepływowym proces uzyskiwania stabilnych, funkcjonalnych membran lipidowych był kontrolowany przez programowalne zawory. Wyposażenie układu w elektrody pozwoliło na przeprowadzenie elektrofizjologicznych pomiarów aktywności nanoporów - białka alfa-hemolizyny w obecności jego małocząsteczkowego inhibitora, w celu wyznaczenia kinetyki procesu blokowania białka błonowego.

Rozdział 4 opisuje transmisję sygnału elektrycznego w sieci kropeł. Opracowano zautomatyzowany system do tworzenia sieci kropeł, połączonych dwuwarstwami lipidowymi. W kroplach na krańcach sieci umieszczone były elektrody pozwalające na pomiar przepływu prądu pomiędzy kolejnymi kroplami. Dodatek różnych stężeń nanoporów alfa-hemolizyny do poszczególnych kropeł zapewnił możliwość prowadzenia nieinwazyjnego pomiaru sygnału z dwuwarstwy znajdującej się wewnątrz sieci kropeł, bez konieczności umieszczania elektrod w ich wnętrzu. Model obwodu elektrycznego opisujący przepływ prądu w sieci kropeł posłużył do interpretacji sygnałów.

W rozdziale 5 opisano rozcieńczanie próbki w zautomatyzowanym systemie. Przedstawiono próbę opracowania systemu, który pozwoli na rozcieńczanie próbek w układzie bezpośrednio przed pomiarem. Zaproponowany system opierał się na precyzyjnym dozowaniu porcji próbek w układzie i ich zautomatyzowanemu rozcieńczaniu.

Rozdział 6 przedstawia mikroprzepływowy system do pasywnego tworzenia membran lipidowych na granicy kropeł w tzw. „pułapkach hydrodynamicznych”. Istniejące rozwiązania oparte na geometrii kanałów mikroprzepływowych, służące do podziału próbki na krople i ich unieruchomienia, posłużyło do wytwarzania dwuwarstw lipidowych. Dzięki powtarzalności operacji tworzenia błon na granicy kropeł o objętości 9 nL i prowadzenia równoległych pomiarów fluorescencji, wyznaczono parametry takie jak przepuszczalność dla małocząsteczkowego barwnika i transport jonów przez kanały białkowe obecne w membranach. Przedstawiono również możliwość przygotowywania rozcieńczeń badanej substancji w kolejnych nanolitrowych kroplach w układzie.

Rozdział 7 zawiera ogólne podsumowanie wyników i wnioski dotyczące dalszych kierunków badań.