



Warszawa, 17 maja 2019r.

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pani mgr inż. Magdaleny Anny Czekalskiej

pt.: “Droplet microfluidic systems for formation and studies of lipid bilayers”,

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pani mgr inż. Magdalena Czekalska ukończyła Międzywydziałowe Studia Biotechnologii I-go i II-go stopnia w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, gdzie w 2012 obroniła pracę inżynierską, a w 2013 pracę magisterską. Obecnie realizuje program Międzynarodowych Studiów Doktoranckich w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk, w Warszawie, którego końcowym efektem jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska zatytułowana **“Droplet microfluidic systems for formation and studies of lipid bilayers”** wykonana pod opieką prof. dr. hab. Piotra Garsteckiego. Rozprawa doktorska Pani Magdaleny Czekalskiej obejmuje dorobek naukowy, na który składają się cztery opublikowane artykuły naukowe, oraz cztery przyznane patenty. W trzech pracach Pani Czekalska jest pierwszą autorką, co wskazuje na jej wiodący udział w powstawaniu tych publikacji. Ponadto, Doktorantka jest autorką jednego artykułu, który obecnie jest w recenzji, realizowała pięć projektów badawczych finansowanych ze środków krajowych oraz funduszy europejskich. Pani Magdalena Czekalska jest także laureatką wielu prestiżowych stypendiów i nagród dla młodych naukowców zarówno w kraju, jak i zagranicą.

Rozprawa doktorska autorstwa Pani Magdaleny Czekalskiej dotyczy badań możliwości tworzenia modelowych dwuwarstw lipidowych oraz analizy zjawisk w nich zachodzących, z wykorzystaniem różnych technik analitycznych. Jako narzędzia do generowania dwuwarstw lipidowych Doktorantka zaproponowała wykorzystanie miniaturowych kroplowych mikrosystemów przepływowych, wskazując na ich szereg zalet zarówno pod względem metrologicznym, jak i ze względu na parametry (w tym przede wszystkim stabilność) dwuwarstw, tworzonych na styku dwóch kropli o nanolitrowych objętościach. Mikrosystemy umożliwiające

operacje na kroplach *ang. droplet microfluidics* opracowywane są do 25 lat i grupa prof. Garsteckiego, pod którego opieką Doktorantka prowadziła badania, ma w tym obszarze ogromne doświadczenie. Narzędzia te charakteryzują się wysoką precyzją tworzenia stabilnych układów kropeł, możliwością integracji różnych systemów detekcji sygnału analitycznego oraz prowadzenia wysokoprzepustowych badań o charakterze podstawowym i aplikacyjnym.

Rozprawa doktorska Pani Magdaleny Czekalskiej podzielona jest na dwie odrębnie numerowane części. Część wstępna zawiera podziękowania, spis projektów w których uczestniczyła doktorantka, jej dorobek naukowy, streszczenia w języku polskim i angielskim, spis treści oraz, bardzo przydatny czytelnikowi, spis stosowanych w pracy skrótów z objaśnieniami. Zasadnicza część rozprawy obejmuje 126 stron i jest podzielona na 7 rozdziałów. Rozdział 1 stanowi część literaturową rozprawy, w której Autorka, opierając się na 147 pozycjach literaturowych, przedstawia zagadnienia dotyczące budowy oraz podstawowych funkcji, jakie pełnią dwuwarstwy lipidowe w organizmach, opisuje najważniejsze modelowe układy służące do ich badań. Doktorantka charakteryzuje m.in.: pęcherzyki lipidowe - liposomy, dwuwarstwy planarne zawieszane między stałymi elementami lub tworzone na stałym podłożu, oraz dwuwarstwy powstające w momencie kontaktu dwóch kropli, wskazując szereg zalet modelu kropłowego w porównaniu z układami planarnymi. Wymienia również najważniejsze obszary badań, w których model dwuwarstwy lipidowej na styku kropeł znalazł zastosowanie. Są to m.in. proteomika, badania transportu membranowego oraz analiza układów o wyższym stopniu organizacji – tzw. multisomów. Mając na uwadze: (i) niewielkie ilości próbek, które mogą być stosowane w modelu kropłowym; (ii) możliwość precyzyjnej kontroli symetrii dwuwarstwy oraz składu pojedynczych kropeł w stosowanym modelu; (iii) kompatybilność modelu z różnymi technikami analitycznymi (w tym również elektrochemicznymi) oraz (iv) wielokrotnego odnawiania badanej dwuwarstwy w trakcie jednego eksperymentu, Autorka dostrzegła potencjał jaki w tego typu badaniach mają kropelkowe mikroukłady przepływowe. W dalszej części przeglądu literaturowego Pani Magdalena Czekalska przybliży czytelnikowi podstawowe pojęcia związane z mikrofluidyką kropłową, sposobami generowania strumieni kropeł w układach dwufazowych oraz opisuje najważniejsze operacje jednostkowe, którym, w odpowiednio skonstruowanych mikrosystemach, mogą być poddawane pojedyncze krople, bądź ich uporządkowane strumienie – inkubacja, detekcja, sortowanie, łączenie i podział. Dalej Doktorantka wymienia i krytycznie analizuje również doniesienia literaturowe opisujące wykorzystanie mikrosystemów do tworzenia dwuwarstw lipidowych zarówno w układach planarnych, opartych np. na geometrii płytki 96-cio dołowej, jak i na granicy kropeł w układach o bardzo różnym stopniu komplikacji modelu, co jest doskonale widoczne na kolejnych, bardzo czytelnych rysunkach, których w całym przeglądzie literaturowym jest 12 – ich liczba może nie wydawać się imponująca, ale każdy z nich jest opracowany na podstawie kilku cytowanych prac,

co w znakomity sposób ułatwia czytelnikowi śledzenie np. postępu w stopniu zaawansowania projektowanych konstrukcji mikrosystemów. Podsumowując część literaturową, po wnikliwej analizie doktorantka precyzyjnie formułuje trzy główne cele badawcze, których realizacja umożliwiłaby stworzenie narzędzi o wysokim potencjale badawczym przyjaznych użytkownikowi:

- konstrukcja mikroukładu przepływowego z automatycznym generowaniem dwuwarstwy lipidowej między dwoma kroplami, wyposażonego w elektrody umożliwiające badanie aktywności białek błonowych (tworzących nanopory) na przykładzie alfa- hemolizyny,
- bazując na poprzedniej geometrii mikrosystemu, opracowanie układu także do pomiarów elektrofizjologicznych, jednakże wzbogaconego o funkcję formowania „sieci” kropeł, które kontaktując się ze sobą tworzyłyby stabilny układ dwuwarstw, w którym w sposób automatyczny krople „sieci” mogłyby być wymieniane na nowe;
- projekt i wykonanie mikrosystemów umożliwiających automatyczne rozcieńczanie badanych próbek wprowadzanych w formie strumienia kropeł oraz do pasywnego formowania par kontaktujących się kropeł w tzw. „pułapkach hydrodynamicznych”

Kolejny rozdział pracy to typowa **część eksperymentalna**, w której Autorka wymienia materiały i odczynniki chemiczne stosowane do przeprowadzenia eksperymentów, opisuje również procedury wytwarzania mikroukładów, procedury formowania strumieni kropeł, elektrochemiczne i optyczne procedury pomiarowe oraz stosowane metody obliczeniowe. Ta część pracy ilustrowana jest ośmioma rysunkami, fotografiami i schematami, w których zabrakło mi, jako inżynierowi, choćby prostego schematu obrazującego technologię wytwarzania samych mikrosystemów.

Dalsza część rozprawy to cztery rozdziały, które Doktorantka poświęca przedstawieniu **założeń badawczych oraz omówieniu i krytycznej dyskusji wyników** uzyskanych podczas realizacji poszczególnych celów badawczych, sformułowanych w podsumowaniu części literaturowej. Każdy z tych rozdziałów rozpoczyna się krótkim wstępem, w którym Doktorantka odnosi się także do prac prowadzonych w innych grupach badawczych, wskazując przy tym obszary, w których jej rozwiązania mogłyby znacznie ułatwić badania nad modelowymi membranami lipidowymi. Taką krótką, wstępną dyskusję podejmowanego problemu uważam za niezwykle cenną ponieważ świadczy ona o świadomości i dojrzałości badawczej Autorki rozprawy. Pierwszym mikrosystemem, którego konstrukcję opisała Pani Magdalena Czekalska był mikroukład umożliwiający zautomatyzowane i sekwencyjne tworzenie stabilnych, modelowych dwuwarstw lipidowych oraz elektrofizjologiczne pomiary pozwalające określić powierzchnię wytworzonej dwuwarstwy oraz monitorować aktywności białka błonowego – alfa-hemolizyny. Jest to moim zdaniem bardzo ciekawa konstrukcja, której opracowanie wymagało od Doktorantki bardzo dobrego przygotowania teoretycznego szczególnie w zakresie teorii

generowania i kontrolowania układów kroplowych. Ponadto, zastosowanie układu dwóch mikroelektrod do bardzo precyzyjnych pomiarów elektrochemicznych, bardzo małych sygnałów prądowych, w objętościach rzędu nanolitów, było także dużym wyzwaniem. Z doświadczenia wiem, że konstrukcje takie na etapie wytwarzania sprawiają wiele problemów szczególnie związanych z precyzyjnym wprowadzaniem, pozycjonowaniem i hermetyzacją elementów takich jak mikroelektrody. Jak widać na załączonych fotografiach obszaru tworzenia modelowych dwuwarstw, Doktorantka bardzo dobrze poradziła sobie z rozwiązaniem tego problemu, wskazała również bardzo szeroki potencjał badawczy opracowanego urządzenia oraz możliwości jego udoskonalenia np. poprzez modyfikację strefy formowania dwuwarstw, czy zastosowanie strefy automatycznego rozcieńczania badanych próbek. Rozwiązania te Autorka przedstawiła w dalszej części rozprawy.

W kolejnym rozdziale Pani Magdalena Czekalska opisuje mikrosystem o zmodyfikowanej strefie generowania układu dwuwarstw lipidowych między czterema kontaktującymi się ze sobą kroplami. Jest to, jak podkreśla Autorka, pierwsza na świecie konstrukcja, w której nie tylko możliwy jest elektrochemiczny pomiar inhibicji białka błonowego bez kontaktu elektrod pomiarowych z układem kropeł tworzących badaną dwuwarstwę, ale także wielokrotna wymiana kropeł w celu tworzenia nowych modelowych membran. Muszę powiedzieć, że jestem pod dużym wrażeniem możliwości metrologicznych przedstawionego w tym rozdziale mikrosystemu. Zarejestrowany sygnał prądowy, pozwala śledzić kinetykę tworzenia modelowej dwuwarstwy, określać jej stabilność i powierzchnię, „elektrochemicznie obserwować” proces wymiany kropeł i tworzenia nowych membran, a także interpretować procesy zachodzące w samej dwuwarstwie (tworzenie nanoporów, transport niewielkich cząsteczek, a nawet inhibicję pojedynczego kanału). Doktorantka, po krótkich rozważaniach teoretycznych, zaproponowała również teoretyczny układ / obwód zastępczy, który umożliwił jej interpretację rejestrowanych sygnałów w trakcie pomiarów elektrofizjologicznych.

Kolejna operacja jednostkowa prowadzona często w mikrosystemach analitycznych to rozcieńczanie badanej próbki. Jej właśnie Autorka poświęca Rozdział 5, w którym przedstawia moduł do automatycznego, kontrolowanego rozcieńczania próbek zawierających wysokie stężenia białka. Wskazując napotkane problemy np. zwilżanie powierzchni mikrokanalów przez tego typu próbki oraz konieczność znacznej rozbudowy aparatury peryferyjnej i systemu sterującego, Doktorantka postanowiła rozwiązać problem rozcieńczania próbki wykorzystując tzw. elementy pasywne – pułapki hydrodynamiczne. Ich geometrię opisała w kolejnym rozdziale rozprawy. Mikromoduły pasywne o chwytnej nazwie „Meter&Store” umożliwiają szereg użytecznych operacji na pojedynczych kroplach o objętości rzędu 10nL (dzielenie, łączenie oraz transport kropeł w ściśle zdefiniowane miejsce w mikroukładzie). Opracowane przez Autorkę mikroukłady zawierały odpowiednio 9 i 12 pasywnych pułapek hydrodynamicznych, przy czym jeden z mikrosystemów zawierał także moduł do precyzyjnego dozowania i rozcieńczania

badanej próbki, co umożliwia kontrolowane generowanie modelowych dwuwarstw między dwoma kroplami, z których jedna zawiera różne stężenia badanego związku. Testy procedury rozcieńczania Doktorantka prowadziła w oparciu o pomiary fluorescencyjne. Jest to kolejna zaleta mikrosystemów – ich transparentność i odpowiednie dobranie barwnika fluorescencyjnego pozwala na precyzyjną ocenę zjawisk zachodzących w mikroskali, w tym także transportu jonów przez kanały białkowe, co zostało potwierdzone przez Autorkę w badaniach transportu jonów wapnia przez modelowe membrany lipidowe o różnej (kontrolowanej) zawartości nanoporów alfa-hydrolizynowych. W celu określenia współczynnika przenikania jonów wapniowych przez modelową membranę, Pani Magdalena Czekalska zaproponowała wykorzystanie selektywnego fluoroforu Fluo-8H oraz precyzyjną kontrolę pH i stężenia EDTA, co pozwoliło jej uzyskać wartości zbliżone do wartości uzyskiwanych w skali makro przez innych badaczy. Za niezwykle ciekawy i wartościowy fragment rozdziału 6 uważam także oszacowanie ilości nanoporów obecnych w modelowej membranie. Kolejny rozdział pracy stanowi **podsumowanie całości przeprowadzonych przez Doktorantkę badań**, zawiera krytyczne odniesienia do rozwiązań komercyjnych oraz opracowań pochodzących z innych zespołów naukowych, które jednak nie przekreślają ich wkładu w badania nad mikrosystemami oraz modelowymi membranami lipidowymi. Doktorantka, co cenne, dostrzega w opracowanych konstrukcjach duży potencjał zarówno pod względem poprawy funkcjonalności samych struktur (np. przez zastosowanie mikroelektrod w pułapkach hydrodynamicznych), jak również wskazuje nowe obszary badań, w których jej konstrukcje mogłyby być wykorzystane (sekwencjonowanie DNA, czy badania mechanizmu wielu powstawania schorzeń).

Praca pod względem edycyjnym napisana jest bardzo starannie, choć rozdział 3, w przeciwieństwie do innych, na stronie wprowadzającej (42) nie ma tytułu, co jest z pewnością niedopatrzeniem Doktorantki. Oprócz niewątpliwie bardzo wysokiej wartości naukowej, mocną stroną pracy są umieszczone rysunki, fotografie kolejnych etapów prowadzonych eksperymentów oraz schematy projektowe przedstawiające geometrię sieci mikrokanałów w projektowanych systemach Lab-on-a-Chip. Na karb młodości zrzuciłbym stosowanie przez Autorkę żargonu naukowego lub skrótów myślowych np. w streszczeniu w jęz. polskim „pomiar fluorescencji” zamiast „pomiar intensywności fluorescencji”, „voltage of the membrane” zamiast np. „constant membrane potential” lub „applied constant potential to the membrane”. Jako czytelnikowi, jednoautorskiej przecież, rozprawy doktorskiej nieco niezręczne wydaje się także stosowanie przez Autorkę narracji w pierwszej osobie liczby mnogiej „we designed, we performed, we measured, etc.”. Jest to forma bardzo często stosowana w publikacjach wieloautorskich i moim zdaniem, w sposób niezamierzony, może utrudniać recenzentom prac rzeczywiste zaangażowanie poszczególnych autorów w badania.

Oprócz drobnych uwag edytorsko-językowych mam również kilka uwag merytorycznych do recenzowanej pracy. Jest ich dosłownie kilka więc podejrzewam, że niedociągnięcia te

Doktorantka umieściła w pracy celowo, żeby sprawdzić czujność recenzenta. Otóż równanie 16 na stronie 87 zostało niepoprawnie zlogarytmowane. Po jednej stronie równania 17 pojawia się logarytm o podstawie 10, a po drugiej wykładnik liczby e, co sugerowałoby, że przeprowadzono logarytmowanie z podstawą e. Nie znalazłem też informacji o zastosowaniu twierdzenia o zmianie podstawy logarytmu, więc niewykluczone, że wkraść się błąd w obliczenie wartości współczynnika przepuszczalności przez modelową membranę. Na stronach 88 (rys. 48 c) i 101 rys. 57 na pierwszy rzut oka widać, że przedstawione zależności nie mają charakteru liniowego, lub można je przybliżyć linią prostą tylko w pewnym zakresie, natomiast Autorka pracy pisze o liniowych zależnościach nie komentując np. wartości współczynnika determinacji R^2 , co ułatwiłoby ocenę poprawności stwierdzenie „zależność liniowa”.

Podsumowując stwierdzam, przedłożona do recenzji praca doktorska autorstwa Pani Magdaleny Czekalskiej reprezentuje bardzo wysoki poziom naukowy. Jest to interdyscyplinarne opracowanie z obszaru miniaturyzacji, mikrobioanalitiky, precyzyjnej metrologii oraz badań podstawowych fizykochemii modelowych dwuwarstw lipidowych. Z pełnym przekonaniem 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 Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk o dopuszczenie Pani mgr inż. Magdaleny Anny Czekalskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego. Jednocześnie, mając na uwadze bardzo wysoki poziom recenzowanej rozprawy poparty trzema publikacjami naukowymi w renomowanych czasopismach naukowych o wysokim współczynniku oddziaływania (IF) oraz czterema przyznanymi patentami stawiam wniosek o jej wyróżnienie.



Michał Chudy