

Warszawa 9 maja 2019r.

Recenzja

Rozprawy doktorskiej mgr Magdaleny Anny Czekalskiej zatytułowanej „Droplet microfluidic systems for formation and studies of lipid bilayers”.

Przedstawiona rozprawa doktorska ma formę monografii liczącej 126+15 stron. Zawiera 58 rysunków i 190 pozycji literatury. Rozprawa ma typowy układ rozdziałów: Wstęp, Materiał i Metody, kolejne cztery dotyczą Wyników i Dyskusji różnych metod wytwarzania i badania mikrokropli tworzących dwuwarstwę lipidową, na zakończenie jest rozdział Podsumowanie i Wnioski.

We wstępie autorka omawia sposoby otrzymywania sztucznych dwuwarstw lipidowych i wykazuje dobrą znajomość tematu pomimo, że prace i najbujniejszy rozwój tej dyscypliny miał miejsce ponad pół wieku temu. Wówczas to powstała najlepsza, ale niesłychanie żmudna technika tworzenia dwuwarstwy z dwóch sprężonych monowarstw lipidowych (Montal i Mueller, 1972). Własności elektryczne tak otrzymanych dwuwarstw zarówno pojemność właściwa jak i oporność właściwa uznawane są za wzorcowe w badaniach dwuwarstw lipidowych. O wiele prostsza jest technika BLM (black lipid membrane), w której lipidy rozpuszczone w dekanie (lub heksadekanie) nanosi się na mały otwór w teflonowej płytce i pozwala się, aby roztwór lipidów spontanicznie rozpląnął się i utworzył dwuwarstwę na niewielkiej części powierzchni otworu. Zaletą obu tych metod jest możliwość wymiany roztworów i wykonanie pomiarów elektrycznych po umieszczeniu elektrod z obu stron błony. Przy pomocy techniki BLM zmierzono w latach '60tych i '70tych XX wieku własności różnych substancji naturalnych i sztucznych tworzących pory w błonach lipidowych

zwłaszcza jądów, toksyn i antybiotyków. Ten kierunek badań zamarł w drugiej połowie lat '70tych, gdy opracowano technikę patch-clampu pozwalającą na pomiar własności elektrycznych kanałów jonowych znajdujących się w błonach komórkowych. Później technikę BLM stosowano sporadycznie najczęściej do badania kanałów jonowych z organelli wewnątrzkomórkowych otrzymywanych w formie małych pęcherzyków po wirowaniu frakcyjnym zhomogenizowanych komórek (w Polsce największe osiągnięcia w tej dziedzinie ma grupa profesora Adama Szewczyka). Główną trudnością metody BLM jest dramatycznie niska skuteczność wbudowania się pęcherzyka z kanałami do czarnej błony lipidowej. Dlatego tak interesująca jest próba wykorzystania techniki tworzenia kropeł w systemie mikroprzepływów do wytwarzania sztucznych błon lipidowych i badania ich właściwości tzw. DIB *droplet interface bilayers*. Pracownia kierowana przez profesora Garsteckiego należy do najlepszych na świecie laboratoriów, w których takie badania są prowadzone.

Metoda tworzenia dwuwarstw lipidowych na granicy dwóch pęcherzyków została opisana w rozdziale 3 dysertacji. Do fazy olejowej zawierającej 1,2-diphytanoyl-*sn*-glycero-3-phosphocholine DPhPC rozpuszczonego w heksadekanie i oleju silikonowym dodawano krople wodnego roztworu 1M KCl. Na granicy faz olej woda powstawała monowarstwa lipidu z grupami hydrofilowymi skierowanymi w stronę fazy wodnej. Gdy dwie takie krople zmuszono do zetknięcia się tworzyła się dwuwarstwa lipidowa. Krople były unieruchamiane w pułapce hydrodynamicznej w której znajdowały się dwie elektrody chlorosrebrne pokryte cienką warstwą agaru. Pojemność utworzonej dwuwarstwy była mierzona przez zastosowanie „trójkątnego” prądu zmiennego o częstotliwości 10Hz i amplitudzie 50mV. Dzięki takiej metodzie można było śledzić rosnącą powierzchnię dwuwarstwy lipidowej. Krople o pojemności 250 do 350 nI tworzyły warstwę o powierzchni odpowiednio od 27000 do 98000 μm^2 . Autorka cytuje publikację, w której oznaczono pojemność właściwą takiej warstwy na 0,64 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$, czyli podobną do warstw otrzymywanych w metodzie BLM. Krytycyzm dotyczący zbyt dużej grubości dwuwarstwy lipidów otrzymywanej metodą BLM stosuje się wobec tego również do metody DIB.

Dwuwarstwę lipidową modyfikowano dodając alfa hemolizynę α HL z gronkowca złocistego – peptydu tworzącego (w niewielkich stężeniach) heptameryczny por o wewnętrznej średnicy przekraczającej 1 nm o bardzo wysokim przewodnictwie rzędu 1 nS w warunkach doświadczenia. Do niespecyficznego blokowania alfa hemolizyny zastosowano gamma cyklodekstrynę γ CD. Doktorantka uzyskała bardzo piękne zapisy otwierania i zamykania porów hemolizyny oraz ich blokowania przez różne stężenia cyklodekstryny pokazując na potencjalną możliwość zastosowania metody DIL do badania białek kanałowych o większym znaczeniu biologicznym i farmakologicznym niż α HL. Jednak napotkała na trudność znaną badaczom kanałów jonowych, czyli otrzymywania i oczyszczania integralnych białek błonowych. α HL pozbawiona deoksycholiny ulegała agregacji (jak słusznie zauważyła doktorantka) i nie wbudowywała się już w błonę. Być może wpływ też miało wysalanie białka przez bardzo wysokie stężenie KCl. Ponieważ białka tworzące kanały jonowe występują zazwyczaj w bardzo małej liczbie w błonie komórek eukariotycznych to ich oczyszczanie i użycie w metodzie DIB jest praktycznie niemożliwe. Do badań kanałów jonowych używa się albo całych komórek albo pęcherzyków błonowych otrzymanych w wyniku oczyszczania poszczególnych frakcji błonowych. Gdyby udało się użyć rzeczywistych błon z komórek w metodzie DIB to wówczas mogłaby ona stanowić konkurencję dla metody patch-clamp w farmakologicznym testowaniu wpływu związków chemicznych na aktywację lub blokowanie pewnych kanałów jonowych o znaczeniu fizjologicznym. Inną możliwością jest wykonanie bezkomórkowej syntezy białka błonowego wewnątrz kropli. Niestety tylko nieliczne kanały jonowe zostały sklonowane, co stanowi trudność w użyciu tego wariantu metody. Należy jednak zdawać sobie sprawę, że zastosowanie metody DIB do badania kanałów jonowych natrafi na poważną trudność jaką jest duża powierzchnię dwuwarstwy lipidów. Szum Johnsona (fluktuacja prądu) jest proporcjonalny do pierwiastka kwadratowego z powierzchni lipidów, w którą wbudowany jest badany kanał. Rzeczywiste kanały jonowe mają amplitudy rzędu od kilku do kilkudziesięciu pA przy czasie otwarć poniżej 0,1ms. W przypadku metody patch clamp powierzchnia lipidów pod pipetą ma tylko 1 μm^2 co daje szum rzędu 0,04 pA; w metodzie BLM powierzchnia ma 1000 μm^2 daje szum 1,3 pA, ale w metodzie prezentowanej w omówionej pracy, gdy powierzchnia wynosi $3 \cdot 10^4 \mu\text{m}^2$ zastosowanie filtrowania odpowiedniego dla kanałów jonowych dałoby szum rzędu 7pA, co bardzo utrudniłoby pomiar kanałów o małym i średnim przewodnictwie.

Oczywiście pisząc to nie mam zastrzeżeń do pomiarów wykonanych z hemolizyną, której przewodnictwo jest 1000 krotnie większe od kanałów jonowych, a zastosowana częstotliwość filtrowania wyników jest niemal 100 razy mniejsza.

W rozdziale czwartym autorka opisuje urządzenie do wytwarzania usieciowanych kropli tworzących szereg łączących się między sobą dwuwarstwami lipidów. Każdy z pęcherzyków z sieci może być usunięty, a inny wstawiony na jego miejsce. Połączenie pomiędzy kroplami było badane elektrochemicznie po zastosowaniu α HL. Hemolizynę dodano do dwóch skrajnych kropli połączonych z elektrodami chlorosrebrnymi. Zapisy przepływającego prądu świadczą o powstaniu elektrycznego połączenia pomiędzy skrajnymi kroplami. Ponieważ w metodzie tej można wymienić tylko środkowe krople to nie zachodzi konieczność przemywania elektrod umieszczonych w skrajnych pęcherzykach. Choć autorka twierdzi, że ta konfiguracja kropeł przypomina połączenia pomiędzy komórkami tworzącymi tkanki to trzeba to sformułowanie uznać raczej za *licentia poetica*.

W rozdziale 5 autorka opisała opracowaną metodą automatycznego rozcieńczania kropli, a w szóstym ciekawy sposób na schwytywanie dwóch kropli do pułapki hydrodynamicznej i utworzeniu dwuwarstwy na powierzchni ich kontaktu, przy czym wielkość kropli wynosiła zaledwie 10nl, czyli 30 razy mniej niż w metodzie opisanej w rozdziale 3. Zaletą omawianej w tym rozdziale metody jest możliwość utworzenia jednocześnie wielu par kropli. Tym razem autorka badała dyfuzję izotiocyjanianu fluoresceiny z jednej kropli do drugiej. Z Rysunku 48 wydaje się, że fluoresceina gromadzi się wyłącznie w kroplach wodnych, a nie w otaczającym je oleju. Recenzenta niepokoi możliwość dyfuzji molekuł fluoresceiny przez warstwę olejową otaczającą krople wodne, a nie wyłącznie przez dwuwarstwę lipidów. Lepszą metodę zastosowaną przez doktorantkę było rejestrowanie fluorescencji barwnika Fluo-8 pod wpływem jonów wapnia przeciekających przez pory zrobione przez α HL. Metody tej użyto do badania skuteczności rozcieńczania α HL. Szkoda, że doktorantka nie sprawdziła jak zmienia się fluorescencja przy jednym stężeniu α HL w zmiennym stężeniu jonów wapnia. Byłoby to zapewne bardziej wiarygodne niż teoretyczne rozważania oparte na znacznej liczbie wstępnych założeń modelu teoretycznego i idealizacji jak np.:, że jony wapnia nie oddziałują z fosfatydylocholiną, a współczynnik dyfuzji dla jonów wapnia jest równy współczynnikowi samodyfuzji wody w nanoporze.

Praca doktorska pani mgr Magdaleny Anny Czekalskiej należy do dziedziny nauk stosowanych, które mają nadzieję na szybkie zastosowanie w naukach podstawowych. Doktorantka współtworzyła i przetestowała kilka wariantów urządzeń mikroprzepływowych, w których tworzone są dwuwarstwy lipidowe na granicy dwóch kontaktujących się pęcherzyków. Pomyślnie je przetestowała, a rozwiązania zastosowane w metodzie zostały opatentowane (doktorantka jest współautorką 4 przyznanych patentów). Recenzent jest przekonany, że metoda ma ogromny potencjał w badaniach biologicznych. Namawiałbym doktorantkę do prezentacji metody mikroprzepływowej na zjazdach czysto biologicznych, biofizycznych, fizjologicznych i farmaceutycznych. Pomysł na badania istotne z punktu widzenia badań podstawowych muszą pochodzić od badaczy rozwiązujących problemy bio.

Drobne błędy znalezione w pracy to:

Str. 2. *At physiological pH...(PC) lipids are not charged.* Oczywiście PC ma w takich warunkach jeden ładunek dodatni i jeden ujemny, ale nawet dodanie określenia netto nie oddaje w pełni właściwości PC. Pęcherzyki z niej zbudowane mają w takich warunkach ujemny potencjał elektrokinetyczny.

Str. 45 na rysunku 22 schemat przepływu jonów przez alfa hemolizynę sugeruje istnienie antyportu jonów chlorkowego i potasowego. Tak raczej nie jest. Zwykle poryny powodują uwolnienie zawartości komórki czyli transport jonów potasu i chlorków w jednym kierunku. W schemacie doświadczalnym zawierającym dwie elektrody chlorosrebrne po ich polaryzacji zachodzi prawdopodobnie tylko przepływ jonów chlorkowych wytwarzanych na jednej elektrodzie, przechodzących przez porynę i pochłanianych na drugiej elektrodzie.

Str. 53. Tablica 2 zawiera wyniki pomiaru czasu jaki upływa pomiędzy wbudowaniem pierwszej i drugiej molekuly alfa hemolizyny do dwuwarstwy. Ponieważ wbudowywanie α HL ma charakter statystyczny to aby uzyskać wyniki o jakiegokolwiek sensownej wiarygodności należałoby wykonać bardzo wiele pomiarów a nie kilka z których połowa nie zakończyła się sukcesem.

Po opisanu pracy jej zalet i występujących w niej drobnych błędów pragnę w podsumowaniu, z pełnym przekonaniem stwierdzić, że rozprawa doktorska mgr Magdaleny Anny Czekalskiej jest pracą bardzo dobrą. Dodatkowo napisana jest

jasnym językiem i zawiera liczne poglądowe ilustracje ułatwiające zrozumienie pracy. Doktorantka dokonała szeregu ważnych udoskonaleń metody tworzenia dwuwarstw lipidowych. Jest pierwszą autorką w trzech pracach i współautorką w jednej pracy posiadającej IF oraz współautorką 4 zgłoszeń patentowych. Dlatego z pełnym przekonaniem stwierdzam, że przedstawiona rozprawa doktorska mgr Magdaleny Anny Czekalskiej zatytułowana „Droplet microfluidic systems for formation and studies of lipid bilayers” spełnia wszelkie wymagania stawiane pracom doktorskim wymienione w artykule 13 ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. z 2003 roku Nr 65, poz. 595, z późniejszymi zmianami), dlatego wnoszę o przyjęcie rozprawy doktorskiej i dopuszczenie jej do publicznej obrony i jednocześnie wnoszę o wyróżnienie pracy.



Prof. dr hab. Krzysztof Dołowy