

„Zastosowania mikroprzepływów w biologii medycynie”

Rozprawa doktorska mgr inż. Witolda Postka

Promotor prof. dr hab. Piotr Garstecki

Promotor pomocniczy dr Ladislav Derzsi

Data opracowania streszczenia 13.06.2019.

Streszczenie

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było opracowanie wysokoprzepustowej metody badania odporności na antybiotyki na poziomie pojedynczych komórek bakterii. Badania opisane w tej rozprawie doktorskiej można podzielić na konstrukcję systemu mikroprzepływowego (A, B, C) i wykorzystanie tego systemu do badań nad odpornością na antybiotyki pojedynczych komórek (D).

A. Precyzyjne i dokładne rozcieńczanie substancji w kroplach o objętości rzędu jednego mikrolitra

W tej części rozprawy za cel postawiono skonstruowanie mikroprzepływowego urządzenia, służącego do generowania szeregu rozcieńczeń próbki, tak by rozcieńczenia były możliwie jak najbardziej powtarzalne i by do każdego rozcieńczenia z szeregu dodawać osobno inną próbkę o stałym stężeniu. Uwagi wymagał problem niedoskonałego wykonania wielu nominalnie identycznych kopii geometrii kanałów do odmierzenia objętości kropeł.

Opracowano rozwiązanie, które wykorzystuje jedną kopię pułapki hydrodynamicznej do przeprowadzania wszystkich operacji odmierzenia kropeł w protokole rozcieńczania, co pozwala na osiągnięcie stałego współczynnika rozcieńczeń z wysoką precyzją i dokładnością. Ponadto opracowano metodę dodawania do każdej kropli z szeregu precyzyjnie odmierzonej kropli innej substancji.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.1. i 4.1.

B. Pasywna emulsyfikacja szeregu mikrolitrowych kropeł

Celem tej części rozprawy było opracowanie geometrii kanału, która pasywnie generowałaby szeregowo rozcieńczenie substancji w serii kropeł, a następnie emulsyfikowałaby otrzymane krople z rozcieńczoną próbką. Opracowane rozwiązanie w sposób pasywny generuje z jednej kropli próbki i szeregu kropeł rozcieńczalnika szereg monodispersyjnych emulsji, z której każda emulsja zawiera inne stężenie próbki. Emulsyfikacja odbywa się na progu (ang. microfluidic step emulsification, MSE) i jest wolna od objętości martwych próbek dzięki pochylni, prowadzącej krople przeznaczone do emulsyfikacji do progu emulsyfikującego.

Zbadano zachowanie kropli w geometrii MSE. Zbadano wpływ napięcia powierzchniowego i prędkości przepływu na parametry generowanych emulsji i na częstotliwość generacji kropeł. Opracowano pasywne rozwiązanie problemu zatykania dysz przez krople powstającej emulsji. Opracowano paralelizację modułu emulsyfikującego ze zwróceniem uwagi na oddziaływania między dyszami i na wpływ przepływu fazy ciągłej wokół emulsyfikowanych kropeł na proces

emulsyfikacji. Zaobserwowano także ruch wsteczny płynów przy pasywnym odrywaniu kropeł emulsji na progu.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.2. i 4.2.

C. Separacja emulsji, ich inkubacja i detekcja wzrostu bakterii

Celem tej części rozprawy było opracowanie metody generacji szeregu emulsji nanolitrowych kropeł pożywki bakteryjnej z bakteriami i z różnym stężeniem antybiotyku, rozdzielenia tych emulsji bez usuwania ich z urządzenia mikroprzepływowego, inkubacji tych emulsji w podwyższonej temperaturze, i detekcji sygnału fluorescencyjnego z inkubowanych kropeł. W skonstruowanym urządzeniu wykorzystano nowatorską metodę separacji emulsji w szeregu w przewodzie polietylenowym przy użyciu trzeciej fazy ciekłej, która nie mieszała się z pozostałymi fazami w układzie. Ta metoda pozwoliła na identyfikację emulsji bez konieczności ich chemicznego znakowania. Inkubacja odbywała się w przewodzie polietylenowym, który można było odłączać od modułu generującego emulsje. Detekcja sygnału fluorescencyjnego z każdej kropli była prowadzona przy użyciu mikroskopu konfokalnego.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.3. i 4.3.

Badanie odporności na antybiotyk z uwzględnieniem efektu inoculum do poziomu populacji składających się z jednej komórki

Celem tej części rozprawy była analiza przeżywalności bakterii w izolowanych populacjach w obecności antybiotyku o różnym stężeniu przy różnej liczebności początkowej populacji bakterii, włącznie z badaniem populacji składających się z pojedynczej izolowanej komórki. Każda populacja była zamknięta w kropli, co izolowało daną populację od pozostałych populacji. Wyznaczono z wysoką przepustowością poziom odporności na antybiotyk w zależności od początkowej liczebności populacji. Pokazano także wpływ stężenia antybiotyku na morfologię populacji bakterii. Wskazano także na możliwość dystrybucji poziomu odporności w izogenicznej populacji bakterii, wskazując na zmienność fenotypową. Opisane tu badania z zakresu mikrobiologii, wykonane klasycznymi metodami, byłyby niezwykle czasochłonne lub co najmniej nietrywialne.

Ta część badań jest opisana w rozdziałach 3.4. i 4.4.