



**UNIWERSYTET
IM. ADAMA MICKIEWICZA
W POZNANIU**

Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości
amyloidogenne ludzkiej cystatyny C

The Influence of Microfluidic Flow and Metallic Nanoparticles on the Amyloidogenic
Properties of Human Cystatin C

mgr Karolina Rucińska

Promotor: prof. dr hab. Maciej Kozak
Promotor pomocniczy: dr Michał Taube

Poznań 2025

Streszczenie

Celem niniejszej pracy było zbadanie wpływu nanocząstek tlenku miedzi (II) (CuO) na strukturę, stabilność konformacji oraz proces agregacji ludzkiej cystatyny C (HCC), a także określenie, czy powstające agregaty HCC samodzielnie wykazują aktywność biologiczną. Badania prowadzono w dwóch układach: podczas inkubacji oraz w mikroprzepływie, co umożliwiło porównanie przebiegu procesu w środowisku modelującym przepływ płynów ustrojowych.

Nanocząstki CuO otrzymano syntetycznie i scharakteryzowano pod względem struktury, składu chemicznego i morfologii. Wykazano, że są monodispersyjne, stabilne i dobrze zdyspergowane, co umożliwiło ich wykorzystanie w badaniach.

W pierwszym etapie oceniono wpływ CuO oraz jonów Cu^{2+} na stabilność HCC. Pomiar fluorescencji z użyciem barwnika SYPRO Orange wykazały obniżenie temperatury topnienia monomeru i dimeru HCC, co wskazuje na zmniejszenie stabilności struktury natywnej cystatyny.

Następnie przeanalizowano przebieg agregacji białka w różnych warunkach. W pH 6 samo HCC nie tworzyło agregatów, natomiast w obecności CuO pojawiał się sygnał ThT oraz pierwsze struktury włókniste obserwowane w AFM, co świadczyło o inicjacji procesu agregacji na powierzchni nanocząstek. W pH 4 białko agregowało spontanicznie, a obecność CuO wpływała na morfologię powstających struktur w sposób zależny od stężenia – od form pierścieniowych po grube wiązki fibryli.

Spektroskopia ATR-FTIR i nanoIR potwierdziły wzrost udziału struktur β w powstałych agregatach HCC (ok. 44–46%) oraz spadek zawartości struktury α -helikalnej. Technika SAXS wykazała wzrost rozmiaru tworzonych struktur i zmianę ich organizacji w kierunku form wydłużonych. W warunkach mikroprzepływu agregacja przebiegała szybciej, ale miała bardziej zróżnicowany charakter – nanoIR wykazał lokalne różnice w udziale struktur β , co świadczy o obecności agregatów na różnych etapach dojrzewania w obrębie tej samej próbki.

Na końcu przeprowadzono badania biologiczne z wykorzystaniem komórek neuroblastomy SH-SY5Y, aby ocenić potencjalny wpływ agregatów HCC oraz nanocząstek CuO na żywotność komórek. Referencyjne próbki nanocząstek i białka w zastosowanych stężeniach nie wykazywały działania cytotoksycznego, natomiast ich połączenie prowadziło do spadku przeżywalności komórek oraz wzrostu poziomu reaktywnych form tlenu (ROS). Wyniki te wskazują, że agregaty HCC tworzące się w obecności nanocząstek CuO mogą indukować stres oksydacyjny, co nadaje im charakter cytotoksyczny.

Uzyskane wyniki pokazują, że nanocząstki CuO oddziałują na wszystkie etapy przemiany ludzkiej cystatyny C - od destabilizacji jej struktury natywnej, poprzez działanie powierzchni CuO jako punktu inicjacji, na którym białko zaczyna się lokalnie gromadzić i ulegać przemianom konformacyjnym, aż po formowanie agregatów o zróżnicowanej strukturze i aktywności biologicznej. Praca stanowi spójny opis wpływu nanocząstek CuO na ludzką cystatynę C zarówno w warunkach inkubacji, jak i w warunkach mikroprzepływu.

Abstract

The aim of this study was to investigate the influence of copper(II) oxide (CuO) nanoparticles on the structure, conformational stability, and aggregation process of human cystatin C (HCC), as well as to determine whether the resulting HCC aggregates exhibit biological activity on their own. The experiments were carried out in two systems - under incubation conditions and in microfluidic flow - which allowed for comparison of the aggregation process in an environment mimicking physiological fluid flow.

CuO nanoparticles were synthetically obtained and characterized in terms of structure, chemical composition, and morphology. They were shown to be monodisperse, stable, and well-dispersed, which enabled their use in subsequent analyses.

In the first stage, the effects of CuO nanoparticles and Cu²⁺ ions on the stability of HCC were evaluated. Fluorescence measurements with SYPRO Orange revealed a decrease in the melting temperature of both the monomeric and dimeric forms of HCC, indicating reduced stability of the native cystatin structure.

Next, the aggregation behavior of HCC was analyzed under different conditions. At pH 6, the protein alone did not form aggregates; however, in the presence of CuO nanoparticles, a detectable ThT signal appeared along with the first fibrillar structures observed by AFM, indicating initiation of aggregation at the nanoparticle surface. At pH 4, HCC aggregated spontaneously, and the presence of CuO modified the morphology of the resulting structures in a concentration-dependent manner, ranging from ring-like forms to thick fibrillar structures.

ATR-FTIR and nanoIR spectroscopy confirmed an increased contribution of β -sheet structures in the HCC aggregates (approx. 44–46%) and a reduction in α -helical content. SAXS analysis revealed an increase in the size of the formed structures and a shift toward more elongated conformations. Under microfluidic conditions, aggregation proceeded more rapidly but exhibited greater heterogeneity - nanoIR revealed local differences in β -sheet content, indicating the coexistence of aggregates at different maturation stages within the same sample.

Finally, biological assays using SH-SY5Y neuroblastoma cells were performed to assess the potential effects of HCC aggregates and CuO nanoparticles on cell viability. Reference nanoparticle and protein samples at the tested concentrations were not cytotoxic, whereas their combination led to decreased cell viability and increased levels of reactive oxygen species (ROS). These results indicate that HCC aggregates formed in the presence of CuO nanoparticles can induce oxidative stress and exhibit cytotoxic effects.

Overall, the results demonstrate that CuO nanoparticles influence all stages of human cystatin C transformation - from destabilization of its native structure, through acting as nucleation sites that promote local protein accumulation and conformational rearrangements, to the formation of aggregates with diverse morphology and biological activity. This work provides a coherent description of the influence of CuO nanoparticles on human cystatin C under both shaking incubation and microfluidic flow conditions.

Dziękuję mojemu promotorowi, prof. dr. hab. Maciejowi Kozakowi, za objęcie opieką naukową niniejszej rozprawy oraz umożliwienie realizacji badań eksperymentalnych, w tym wyjazdów pomiarowych do ośrodków zewnętrznych.

Dziękuję mojemu promotorowi pomocniczemu, dr. Michałowi Taube, za cenne uwagi merytoryczne, szczególnie dotyczące treści rozprawy.

Dziękuję prof. dr. hab. Wojciechowi M. Kwiatkowi za możliwość udziału w pracach badawczych realizowanych w ramach projektu oraz wsparcie podczas pomiarów synchrotronowych.

Dziękuję dr. Lucji Przysieckiej za wprowadzenie w metody badań komórkowych oraz pomoc merytoryczną podczas ich realizacji.

Dziękuję prof. dr. hab. Ewie Banachowicz za wspólne pomiary i gotowość do pomocy. Dziękuję prof. dr. hab. Zbigniewowi Fojudowi za życzliwość i dobre słowo.

Dziękuję dr. Zuzannie Pietralik-Molińskiej za cenne uwagi merytoryczne oraz wsparcie podczas przygotowywania niniejszej pracy. Dziękuję dr. Darii Wojciechowskiej oraz dr. Ahmetowi Kertmenowi za wspólny czas w laboratorium i okazaną życzliwość. Dziękuję także pozostałym pracownikom i doktorantom Zakładu Fizyki Biomedycznej UAM za współpracę przez te kilka lat.

Dziękuję mgr Joannie Maksim za wsparcie eksperymentalne i przyjacielskie, wspólne godziny spędzone w laboratorium oraz niezastąpione towarzystwo podczas licznych wyjazdów naukowych. Dziękuję mgr Joannie Patalas-Stępień za wsparcie emocjonalne w trudnych momentach.

Dziękuję także moim najbliższym za towarzyszenie mi w tym procesie oraz nieustanną wiarę we mnie.

Prace badawcze przedstawione w niniejszej rozprawie zostały zrealizowane w ramach projektu OPUS, finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki (nr 2021/41/B/ST4/03807).

Spis treści

1	CEL PRACY	9
2	MOTYWACJA DO PODJĘCIA PROBLEMU BADAWCZEGO	11
3	WPROWADZENIE	12
3.1	CHOROBY NEURODEGENERACYJNE	12
3.2	NANOCZĄSTKI – ICH OBECNOŚĆ W ŚRODOWISKU ORAZ DZIAŁANIE BIOLOGICZNE	19
3.3	LUDZKA CYSTATYNA C	26
3.3.1	<i>Struktura i funkcja cystatyny C</i>	26
3.3.2	<i>Cystatyna C jako białko amyloidogenne</i>	28
3.3.3	<i>Cystatyna C i amyloidoza</i>	30
3.4	ROLA MIEDZI I CYNKU W CHOROBY NEURODEGENERACYJNYCH	32
3.5	ROLA PRZEŁYWU W UKŁADZIE NACZYNIOWYM NA PROCESY AGREGACJI BIAŁEK	34
4	METODY BADAWCZE	35
4.1	DETEKCJA PROCESU AMYLOIDOGENEZY METODĄ FLUORESCENCJI TIOFLAWINY T (ThT)	35
4.2	MIKROSKOPIA SIŁ ATOMOWYCH (AFM)	36
4.3	TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (TEM)	37
4.4	SPEKTROSKOPIA DICHROIZMU KOŁOWEGO (CD)	38
4.5	SPEKTROSKOPIA UV-Vis	38
4.6	DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA (DLS)	40
4.7	SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI (FTIR)	40
4.8	MAŁOKĄTOWE ROZPRASZANIE PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (SAXS)	42
4.9	ABSORPCJA PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (XAS)	44
4.10	DYFRAKCJA PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (XRD)	45
4.11	PRZEŁYW MIKROFLUIDYCZNY	46
4.12	ANALIZA TERMICZNEJ STABILNOŚCI BIAŁEK METODĄ TERMOFLUORYMETRYCZNĄ	46
4.13	TESTY PRZEŻYWAŁNOŚCI KOMÓREK (WST-1)	47
4.14	OZNACZANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU ZA POMOCĄ SONDY DIACETAT 2',7'- DICHLORODIHYDROFLUORESCYNY (DCFH-DA)	48
5	CZEŚĆ DOŚWIADCZALNA – MATERIAŁY I METODY	49
5.1	NADPRODUKCJA LUDZKIEJ CYSTATYNY C	49
5.2	OCZYSZCZANIE LUDZKIEJ CYSTATYNY C	50
5.3	ANALIZA ELEKTROFORETYCZNA SDS-PAGE	50
5.4	SYNTEZA NANOCZĄSTEK TLENU MIEDZI (II)	51
5.5	SYNTEZA NANOCZĄSTEK MIEDZI	51
5.6	SPEKTROSKOPIA UV-Vis	52
5.7	DYNAMICZNE ROZPRASZANIE ŚWIATŁA (DLS)	52
5.8	DYFRAKCJA PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (XRD)	52
5.9	ABSORPCJA PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (XAS)	52
5.10	MAŁOKĄTOWE ROZPRASZANIE PROMIENIOWANIA RENTGENOWSKIEGO (SAXS)	53
5.11	TRANSMISYJNA MIKROSKOPIA ELEKTRONOWA (TEM)	53
5.12	SPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI (FTIR)	54
5.13	SPEKTROSKOPIA DICHROIZMU KOŁOWEGO (CD)	54
5.14	TESTY Z UŻYCIEM FLUORESCENCYJNEGO CZYTNIKA PŁYTEK	54
5.15	MIKROSKOPIA SIŁ ATOMOWYCH (AFM)	55
5.16	NANOSPEKTROSKOPIA W PODCZERWIENI AFM-IR (NANOIR)	55
5.17	ANALIZA TERMICZNEJ STABILNOŚCI BIAŁEK	55

5.18	TESTY PRZEŻYwalNOŚCI KOMÓREK (WST-1)	56
5.19	OZNACZANIE REAKTYWNYCH FORM TLENU ZA POMOCĄ SONDY DCFH-DA	56
5.20	PRZEPLYW MIKROFLUIDYCZNY	56
6	WYNIKI	60
6.1	CHARAKTERYSTYKA NANOCZĄSTEK	60
6.1.1	<i>Nanocząstki tlenku miedzi (II)</i>	60
6.1.2	<i>Nanocząstki miedzi</i>	65
6.1.3	<i>Nanocząstki komercyjne</i>	71
6.2	SELEKCJA NANOCZĄSTEK DO DALSZYCH BADAŃ	76
6.3	CHARAKTERYSTYKA LUDZKIEJ CYSTATYNY C	77
6.4	CHARAKTERYSTYKA UKŁADÓW HCC Z NANOCZĄSTKAMI CuO	81
6.4.1	<i>Stabilność układów HCC z Cu²⁺ oraz CuO NPs</i>	81
6.4.2	<i>Wpływ nanocząstek CuO na agregację amyloidową ludzkiej cystatyny C w różnych warunkach pH</i>	84
6.4.3	<i>Ocena cytotoksyczności agregatów HCC i CuO NP na modelową linię komórkową neuroblastomy SH-SY5Y</i>	102
6.4.4	<i>Wpływ warunków mikroprzepływowych na proces agregacji HCC</i>	112
6.4.5	<i>Badania SAXS procesu agregacji HCC w przepływie mikrofluidycznym</i>	125
6.4.6	<i>Badanie procesów agregacji HCC metodą połączonej spektroskopii FTIR i AFM</i>	134
7	DYSKUSJA WYNIKÓW	144
8	WNIOSKI	156
9	BIBLIOGRAFIA	158

1 Cel pracy

Celem niniejszej pracy było określenie, czy oraz w jaki sposób nanocząstki tlenku miedzi (II) (CuO) oraz przepływ mikrofluidyczny wpływają na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C (HCC). Założono, że obecność nanocząstek metalicznych oraz siły ścinające mogą zaburzać stabilność struktury natywnej białka, inicjować lub przyspieszać agregację oraz prowadzić do powstawania agregatów o zmienionej strukturze i morfologii.

W celu zweryfikowania tej hipotezy zaplanowano realizację następujących celi etapowych:

1. Uzyskanie nanocząstek CuO do badań

Przewidziano otrzymanie nanocząstek tlenku miedzi (II) o małych rozmiarach i kontrolowanych właściwościach fizykochemicznych, umożliwiających ocenę ich oddziaływania z białkiem HCC.

2. Określenie właściwości fizykochemicznych nanocząstek CuO

Planowano określić rozmiar, morfologię, stabilność i strukturę krystaliczną nanocząstek CuO, wykorzystując dyfrakcję rentgenowską (XRD), spektroskopię UV-Vis, dynamiczne rozpraszanie światła (DLS), mikroskopię sił atomowych (AFM), transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) oraz spektroskopię absorpcji rentgenowskiej (XAS), aby zidentyfikować właściwości istotne dla ich interakcji z HCC.

3. Uzyskanie rekombinowanej ludzkiej cystatyny C

Założono uzyskanie rekombinowanej, czystej cystatyny C, stanowiącej materiał wyjściowy do dalszych badań.

4. Zbadanie wpływu nanocząstek CuO na stabilność i agregację HCC

Celem było ustalenie, czy nanocząstki CuO wpływają na stabilność struktury natywnej HCC, skład jej struktury drugorzędowej, przebieg procesu agregacji oraz morfologię powstających agregatów.

Planowano zastosować komplementarny zestaw technik analitycznych: spektroskopię UV-Vis, spektroskopię w podczerwieni z transformacją Fouriera (FTIR), nanospektroskopię IR w oparciu o mikroskopię sił atomowych (AFM-IR/nanoIR), dichroizm kołowy (CD), klasyczną mikroskopię sił atomowych (AFM) oraz rozpraszanie rentgenowskie pod małymi kątami (SAXS).

5. Opracowanie systemu mikroprzepływowego do badań agregacji HCC

Założono samodzielne opracowanie układu umożliwiającego prowadzenie inkubacji białka w warunkach kontrolowanego przepływu oraz analizę wpływu sił ścinających na mechanizm agregacji - zarówno w warunkach bez dodatku nanocząstek CuO, jak i w ich obecności.

6. Określenie cytotoksyczności powstających agregatów HCC

Celem było zbadanie wpływu nanocząstek CuO oraz agregatów HCC - zarówno tych powstających w obecności nanocząstek, jak i formowanych niezależnie - na komórki SH-SY5Y, ze szczególnym uwzględnieniem przeżywalności komórek oraz poziomu indukowanych reaktywnych form tlenu (ROS).

2 Motywacja do podjęcia problemu badawczego

Rosnąca częstość występowania chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera, choroba Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne, podkreśla potrzebę dokładniejszego zrozumienia procesów prowadzących do odkładania patologicznych białek. Coraz więcej danych wskazuje, że na rozwój tych schorzeń wpływają nie tylko czynniki genetyczne, lecz także środowiskowe - w tym zanieczyszczenia powietrza zawierające nanocząstki metali. Ultradrobne cząstki, w tym również tlenki miedzi, mogą docierać do mózgu, akumulować się w tkankach i sprzyjać stresowi oksydacyjnemu, stanom zapalnym oraz nieprawidłowemu fałdowaniu białek.

W kontekście amyloidogenezy najczęściej bada się β -amyloid, białko tau czy α -synukleinę, natomiast mniej uwagi poświęcono ludzkiej cystatynie C (HCC), mimo że jej złogi występują w ścianach naczyń mózgowych i prowadzą do dziedzicznej angiopatii amyloidowej. Ludzka cystatyna C jest białkiem o dobrze poznanej strukturze i pełni funkcje ochronne w układzie nerwowym, jednak w określonych warunkach może ulegać agregacji. Mechanizmy leżące u podstaw przejścia od formy natywnej do struktur amyloidowych wciąż nie są w pełni poznane.

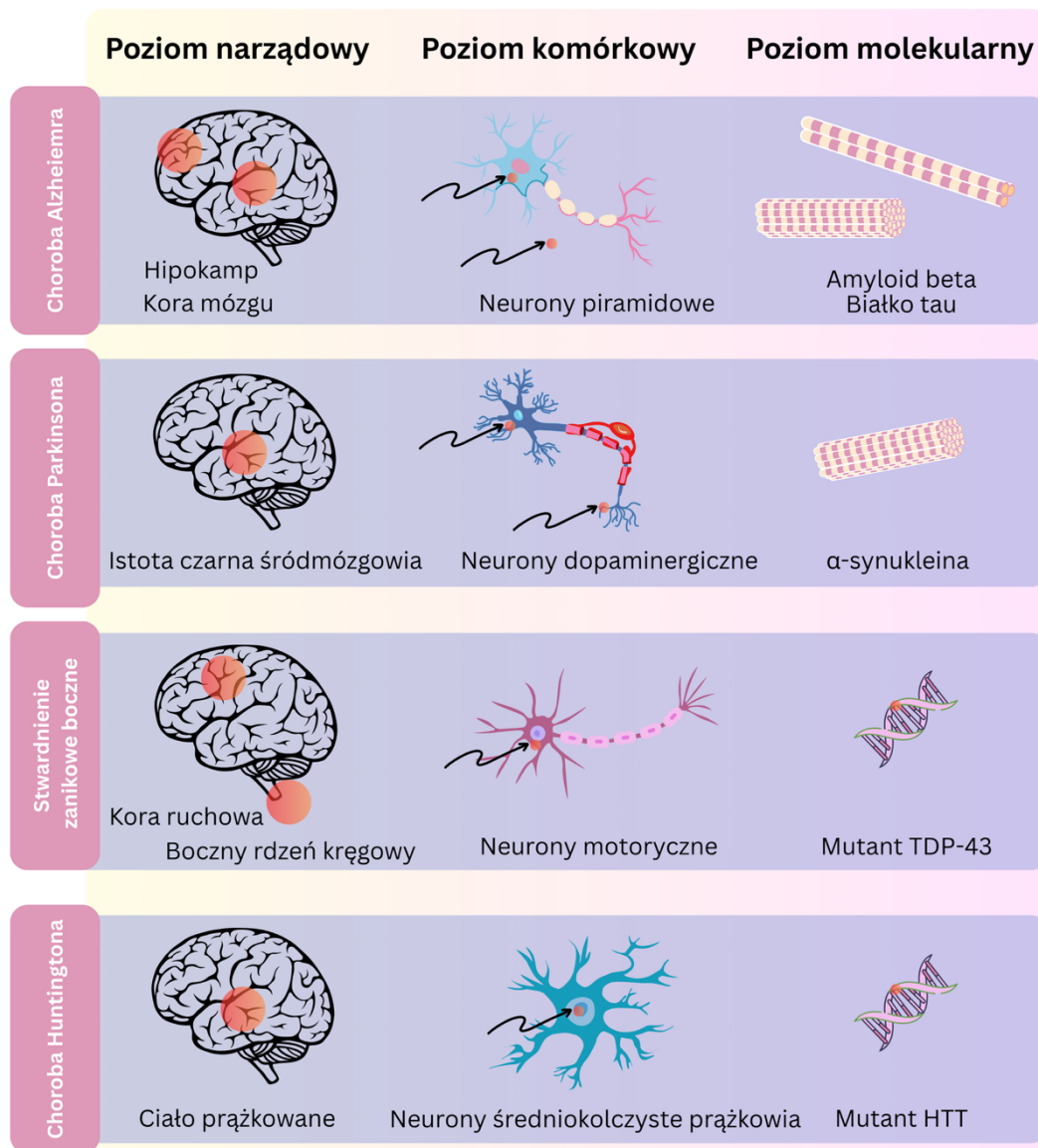
Jednym z czynników, które mogą modulować ten proces, jest miedź. Występuje ona fizjologicznie w mózgu, lecz zaburzenia jej homeostazy sprzyjają powstawaniu reaktywnych form tlenu i destabilizacji białek. Nanocząstki tlenku miedzi (CuO) mogą dodatkowo uwalniać jony Cu^{2+} oraz wiązać białka na swojej powierzchni, wpływając na ich strukturę i potencjalnie inicjując agregację. Mimo rosnącego zainteresowania interakcjami nanomateriałów z białkami, wpływ nanocząstek CuO na ludzką cystatynę C nie został dotąd zbadany. Drugim ważnym aspektem jest środowisko fizyczne, w którym zachodzi agregacja. W organizmie białka przemieszczają się wraz z krwią lub płynem mózgowo-rdzeniowym i podlegają działaniu sił ścinających. Może to wpływać zarówno na kinetykę agregacji, jak i interakcje białka z nanocząstkami. Ludzka cystatyna C nie była dotychczas badana w takich warunkach, co stanowiło wyraźną lukę badawczą. Z tego względu podjęto próbę zbadania, jak obecność nanocząstek CuO oraz środowisko przepływu wpływają na strukturę, stabilność i agregację HCC, a także czy mogą prowadzić do powstawania form o znaczeniu biologicznym.

3 Wprowadzenie

3.1 Choroby neurodegeneracyjne

Wraz z postępującym wzrostem długości życia, choroby neurodegeneracyjne zyskały status jednego z najpoważniejszych wyzwań zdrowotnych XXI wieku. Według prognoz Global Burden of Disease Study, liczba osób z demencją wzrośnie z 57,4 miliona w 2019 roku do 152,8 miliona w 2050 roku. Wzrost ten będzie najbardziej widoczny w Europie, głównie z uwagi na proces starzenia się populacji oraz wydłużający się średni wiek życia w krajach rozwiniętych. Kobiety, które mają dłuższą średnią prognozowaną długość życia, nadal będą stanowiły większą część chorych [1]. Zjawisko to stanowi poważne wyzwanie dla systemów opieki zdrowotnej, ponieważ wzrost liczby osób dotkniętych demencją wiąże się z pogarszającą się jakością życia pacjentów oraz rosnącymi kosztami leczenia i opieki. W obliczu tego problemu, choroby neurodegeneracyjne stają się coraz bardziej istotnym elementem globalnego obciążenia zdrowotnego [2].

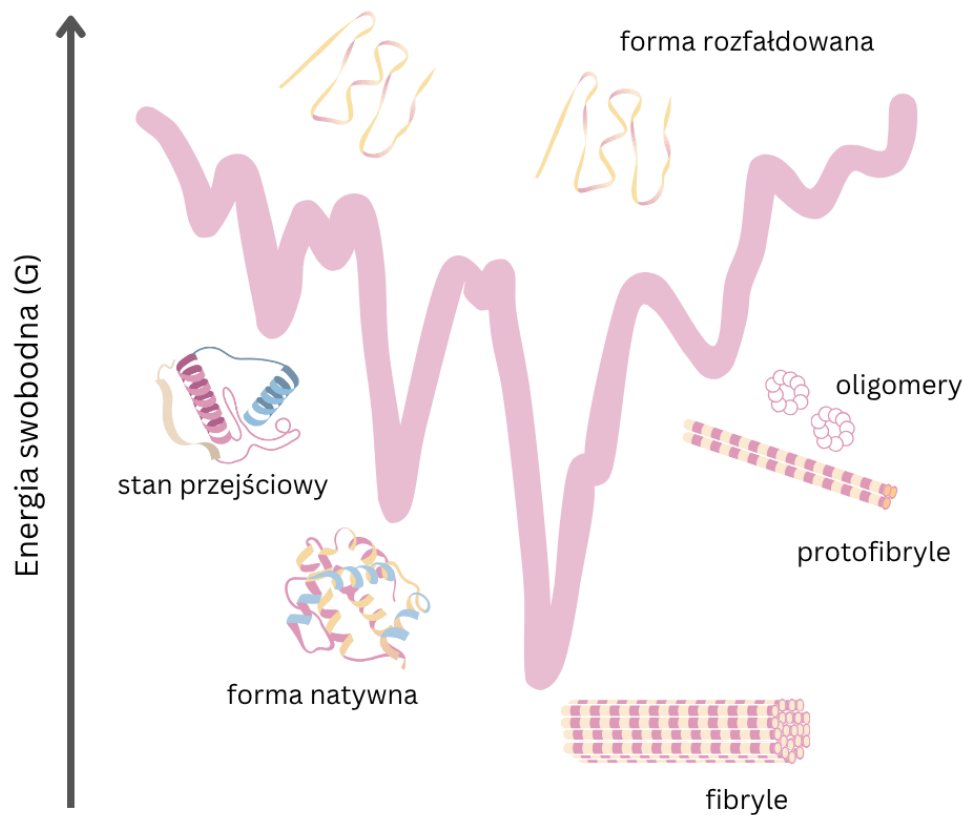
Demencja, w tym jej najczęstsza forma – choroba Alzheimera (ang. Alzheimer's disease, AD), a także inne schorzenia, takie jak choroba Parkinsona (ang. Parkinson's disease, PD), stwardnienie zanikowe boczne (ang. amyotrophic lateral sclerosis, ALS), czy choroba Huntingtona (ang. Huntington's disease, HD) prowadzą do stopniowej utraty funkcji poznawczych oraz zaburzeń behawioralnych, co ma istotny wpływ na codzienne życie pacjentów i ich rodzin [3–7]. Pomimo intensywnych badań nad przyczynami i mechanizmami tych chorób, wciąż brakuje jednoznacznych odpowiedzi na pytanie, jakie czynniki inicjują proces neurodegeneracji. Hipotezy sugerują, że kluczową rolę odgrywa akumulacja patologicznych białek, takich jak beta-amyloid (AD), tau (AD), α -synukleina (PD), TDP-43 (ALS) czy zmutowane białko huntingtina (mHTT; HD), które gromadzą się w komórkach nerwowych, prowadząc do ich uszkodzenia i śmierci [8,9]. Zestawienie charakterystycznych cech molekularnych i komórkowych wymienionych wyżej chorób neurodegeneracyjnych przedstawiono na rysunku 1.



Rysunek 1. Zestawienie kluczowych cech molekularnych i komórkowych w wybranych chorobach neurodegeneracyjnych. Przedstawiono lokalizację obrazów zmienionych patologicznie w mózgu, neurony dotknięte zmianami degeneracyjnymi oraz białko powiązane z danym schorzeniem.

Agregacja białek to istotny element patologiczny w chorobach neurodegeneracyjnych [10], a nieprawidłowe fałdowanie białek może być kluczowym mechanizmem ich rozwoju [11]. W wyniku tego procesu białka przyjmują nieprawidłową strukturę, co sprawia, że stają się one podatne na tworzenie agregatów. Zjawisko to wiąże się z nieprawidłowymi interakcjami hydrofobowymi, prowadzącymi do powstawania pośrednich form, takich jak oligomery i protofibryle, będących zaawansowanymi etapami tego mechanizmu [12]. Częściowe rozfałdowanie białek ujawnia grupy chemiczne o charakterze hydrofobowym, które sprzyjają powstawaniu struktur β , kluczowych dla formowania dojrzałych fibryli [11,13]. Podczas procesu fibrylizacji oligomeryczne formy są szybko tworzone, a to właśnie one wykazują największą cytotoksyczność [14,15]. Koncepcja lejka zwijania (ang. folding funnel), wywodząca się z teorii krajobrazu

energetycznego, ilustrującego różne stany energetyczne białka w przestrzeni konformacyjnej (rysunek 2), przedstawia proces fałdowania białek, który może prowadzić do powstawania tych patologicznych agregatów.



Rysunek 2. Schemat energetyczny fałdowania białka i tworzenia struktur amyloidowych.

Cząsteczki białka w wyniku nieprawidłowego fałdowania mogą przyjmować alternatywne konformacje, które sprzyjają ich agregacji. Powstające w ten sposób agregaty, nazywane amyloidem, charakteryzują się specyficzną strukturą i właściwościami, takimi jak odporność na degradację proteolityczną oraz zdolność do tworzenia włóknistych struktur. Początkowo termin „amyloid” odnosił się do zewnątrzkomórkowych depozytów białkowych odkładających się w przebiegu niektórych chorób, jak na przykład choroba Alzheimera. Z czasem, po odkryciu agregatów występujących także wewnątrz komórek, pojęcie to zostało rozszerzone na inne typy białkowych złogów. Wsparcie dla hipotezy zakładającej przyczynowy wpływ nieprawidłowego fałdowania białek na rozwój chorób neurodegeneracyjnych pochodzi z badań genetycznych. Mutacje w genach kodujących białkowe składniki fibrylarnych agregatów są powiązane z dziedzicznymi postaciami schorzeń, takich jak choroba Alzheimera, Huntingtona, Parkinsona czy stwardnienie zanikowe boczne. Formy rodzinne tych chorób zazwyczaj charakteryzują się wcześniejszym początkiem oraz większym nasileniem objawów w porównaniu do przypadków sporadycznych [16].

Wszystkie te choroby - zarówno ich warianty sporadyczne jak i dziedziczne - łączy obecność złogów białkowych w tkankach, przy czym białka te w formie natywnej są zwykle rozpuszczalne. Depozyty mogą gromadzić się w mózgu, tkance mięśniowo-szkieletowej lub innych narządach. Zmienione chorobowo tkanki zawierają włókna, czasem zorganizowane w płytki, złożone z jednego dominującego rodzaju białka charakterystycznego dla danej jednostki chorobowej (np. peptydu amyloidu beta w chorobie Alzheimera). Choć struktury natywne tych białek różnią się od siebie, w postaci amyloidu wykazują uderzające podobieństwo, co sugerowało, że struktury molekularne form zagregowanych są zasadniczo takie same [17]. Wykrycie charakterystycznej struktury „krzyżowej” (cross- β) w dyfrakcji rentgenowskiej oraz typowej morfologii złogów w mikroskopii elektronowej jest obecnie uznawane za kryterium konieczne do sklasyfikowania takich agregatów jako amyloidu [18].

Przykładem schorzenia, w którym patologiczne złoże amyloidu odgrywają kluczową rolę, jest choroba Alzheimera. Po raz pierwszy objawy i charakterystyczne zmiany mózgowie obecne w tej jednostce chorobowej zostały opisane przez neuropatologa i psychiatrę Aloisa Alzheimera w 1906 roku u pacjentki cierpiącej na postępujące zaburzenia pamięci, dezorientację oraz zmiany osobowości. Badania pośmiertne wykazały obecność dwóch dominujących typów patologicznych struktur: zewnątrzkomórkowych złogów amyloidu beta, nazywanych blaszkami starczymi, oraz wewnątrzneuronalnych splątków neurofibrylarnych, zawierających hiperfosforylowane białko tau [19]. Obecnie choroba Alzheimera jest najczęstszą formą otępienia występującą wśród osób starszych. Ma charakter postępujący i zwyrodnieniowy, prowadząc do stopniowego zaniku funkcji poznawczych i degradacji neuronów, szczególnie tych zlokalizowanych w korze mózgowej, hipokampie i ciele migdałowatym. Wraz z rozwojem schorzenia pacjenci doświadczają nie tylko utraty pamięci, ale też zaburzeń komunikacyjnych (afazja), trudności w rozpoznawaniu przedmiotów (agnozja) czy wykonywaniu codziennych czynności (apraksja) [20]. W obrazie neuropatologicznym dominuje akumulacja peptydów amyloidu beta, zwłaszcza jego formy o długości 42 aminokwasów ($A\beta_{1-42}$), która wykazuje skłonność do tworzenia neurotoksycznych agregatów. Proces ten rozpoczyna się na długo przed wystąpieniem objawów klinicznych i przebiega powoli, prowadząc do narastających uszkodzeń synaps oraz degradacji neuronów. Dodatkowo obserwuje się aktywację komórek glejowych (astrocytów i mikrogleju), co może pogłębiać neurodegenerację i przyczyniać się do dysfunkcji bariery krew-mózg [21]. Choć dokładne mechanizmy prowadzące do rozwoju choroby nie są w pełni poznane, wiadomo, że zaawansowane zmiany w mózgu korelują z gromadzeniem się białek zmienionych patologicznie oraz utratą neuronów cholinergicznym w przedomózgowiu [20]. Dotychczasowe leczenie koncentruje się głównie na łagodzeniu objawów i opóźnianiu postępu choroby. Intensywne badania nad nowymi strategiami terapeutycznymi wciąż trwają, a ich skuteczność zależy w dużej mierze od lepszego zrozumienia złożonej patogenezy tej jednostki.

Etiologia choroby Alzheimera wciąż nie jest do końca wyjaśniona. Istnieje szereg hipotez próbujących opisać mechanizmy jej rozwoju, z których najważniejszą pozostaje

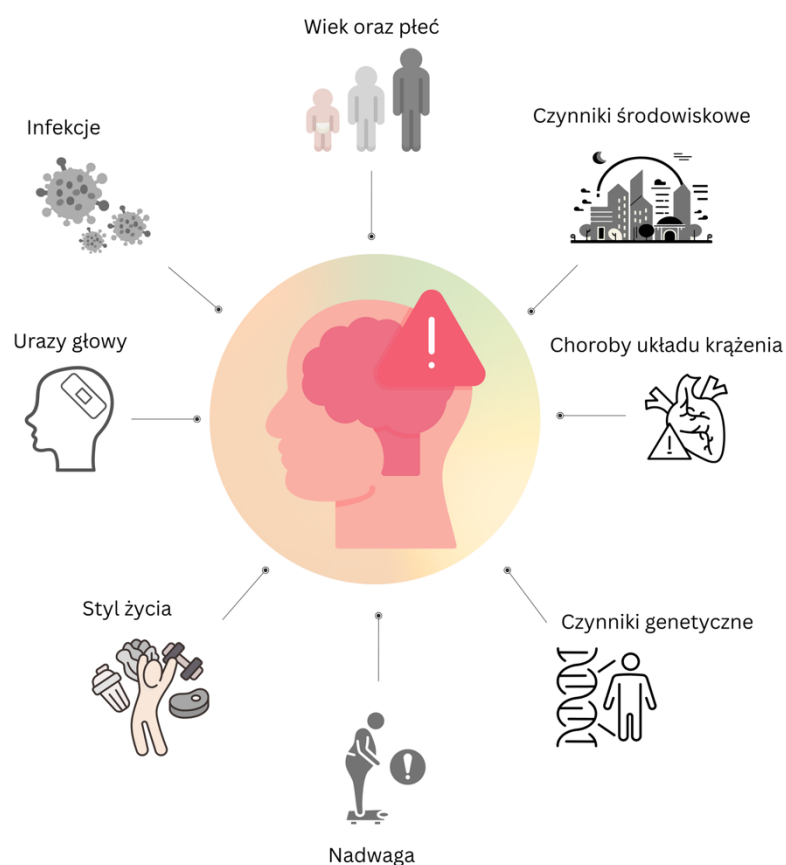
tzw. *hipoteza kaskady amyloidowej* [22]. Zgodnie z jej założeniami, kluczową rolę w patogenezie odgrywa zaburzenie w procesie przetwarzania białka prekursorowego amyloidu (ang. amyloid protein precursor APP), prowadzące do nadmiernej produkcji patologicznych form amyloidu beta, zwłaszcza wspomnianego wcześniej $A\beta_{1-42}$. Rozwinięciem tej koncepcji jest teoria zakładająca, że toksyczność amyloidu beta wynika głównie z jego rozpuszczalnych form - dimerów i oligomerów - które pojawiają się na bardzo wczesnym etapie choroby, jeszcze przed wystąpieniem objawów klinicznych oraz przed uformowaniem się dojrzałych blaszek [23]. Wskazuje to na potrzebę opracowania metod diagnostycznych umożliwiających wykrycie patologii na etapie przedklinicznym.

Alternatywne teorie sugerują, że akumulacja amyloidu i białka tau niekoniecznie stanowi pierwotną przyczynę choroby, lecz może być efektem wtórnym innych zaburzeń zachodzących w neuronach. Wśród potencjalnych mechanizmów wymienia się m.in. nieprawidłowości w metabolizmie glukozy [24], zakłócenia w regulacji cyklu komórkowego i procesu apoptozy [25], a także zwiększony stres oksydacyjny [26]. Starzenie organizmu wiąże się ze spadkiem efektywności mechanizmów antyoksydacyjnych organizmu, co w połączeniu ze zwiększoną produkcją reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species, ROS) sprzyja powstawaniu stresu oksydacyjnego i uszkodzeniom komórkowym [27]. Jedną z teorii, tzw. *hipoteza kaskady mitochondrialnej*, zakłada, że dziedziczne różnice w budowie łańcucha oddechowego determinują poziom produkcji ROS w komórce. Stopniowa akumulacja uszkodzeń mitochondrialnych może uruchamiać mechanizmy kompensacyjne, w tym reaktywację cyklu komórkowego i nasilone odkładanie amyloidu beta, co w konsekwencji prowadzi do śmierci neuronów [28]. Choć wiele badań potwierdza istotną rolę dysfunkcji mitochondriów i stresu oksydacyjnego w chorobie Alzheimera, brakuje jednak jednoznacznych ustaleń, czy mają one charakter przyczynowy, czy są jedynie skutkiem postępujących procesów neurodegeneracyjnych.

Należy jednak podkreślić, że nie wszystkie choroby neurodegeneracyjne opierają się na mechanizmie odkładania amyloidu w obrębie neuronów. W zależności od jednostki chorobowej, zmiany patologiczne mogą obejmować różne typy białek, struktury komórkowe oraz lokalizacje odkładania złogów. Przykładowo, w przypadku sporadycznej mózgowej angiopatii amyloidowej (ang. cerebral amyloid angiopathy, CAA) zwanej też amyloidozą typu islandzkiego, dochodzi do akumulacji amyloidu β głównie w ścianach naczyń krwionośnych mózgu, co prowadzi do ich osłabienia, zwiększonej przepuszczalności oraz podwyższonego ryzyka krwotoków śródmózgowych. Niska zdolność do usuwania amyloidu sprzyja dalszemu odkładaniu się tego białka w naczyniach [29]. Odmienny mechanizm chorobowy leży u podstaw choroby Wilsona - genetycznego schorzenia metabolicznego, które prowadzi do neurodegeneracji wskutek patologicznego gromadzenia miedzi w hepatocytach oraz komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Nadmiar tego metalu w wątrobie i mózgu wywołuje stres oksydacyjny oraz zakłóca homeostazę komórkową, prowadząc do uszkodzenia struktur neuronalnych. W zależności od nasilenia objawów, choroba Wilsona może manifestować się postępującymi zaburzeniami wątroby, a także objawami

neurologicznymi i psychiatrycznymi [30]. Powyższe przykłady ilustrują znaczną różnorodność mechanizmów prowadzących do neurodegeneracji, co stanowi istotne wyzwanie zarówno w kontekście diagnostyki, jak i opracowywania skutecznych strategii terapeutycznych.

Wśród czynników ryzyka rozwoju neurodegeneracji (rysunek 3) coraz większą uwagę poświęca się przewlekłemu stanowi zapalnemu w obrębie ośrodkowego układu nerwowego. Nadmierna aktywacja mikrogleju prowadzi do uszkodzenia neuronów oraz nasilenia objawów neuropsychiatrycznych, takich jak lęk, depresja czy agresja, co obserwuje się m.in. w przebiegu choroby Alzheimera. Neurozapalenie może poprzedzać klasyczne zmiany neuropatologiczne, takie jak odkładanie amyloidu β i białka tau, a także nasilać ich neurotoksyczne działanie [31].



Rysunek 3. Czynniki ryzyka rozwoju procesów neurodegeneracyjnych.

Do czynników sprzyjających rozwojowi stanu zapalnego w mózgu należą m.in. dysbioza jelitowa [32], przewlekły stres [33], otyłość [34], palenie tytoniu oraz ekspozycja na zanieczyszczenia środowiskowe, w tym hałas i smog [35–37]. Badania przeprowadzone na bliźniętach jednojajowych wykazały stosunkowo niski poziom zgodności zachorowań w podeszłym wieku na chorobę Alzheimera, co sugeruje istotny udział czynników pozagenetycznych w jej etiologii. Na tej podstawie zaproponowano, że czynniki epigenetyczne mogą odgrywać kluczową rolę w inicjowaniu procesów

neurodegeneracyjnych [20]. Jedną z pierwszych prób ujęcia tej koncepcji był model LEARn (ang. latent early-life associated regulation). Zgodnie z tą hipotezą, ekspozycja na czynniki środowiskowe we wczesnym okresie życia - takie jak metale ciężkie czy przewlekły stres - może wpływać na epigenetyczne mechanizmy regulujące ekspresję genów istotnych dla patogenezy choroby Alzheimera. W kontekście profilaktyki podkreśla się znaczenie przywracania zdrowego środowiska jako jednego z kluczowych działań prewencyjnych [20,38].

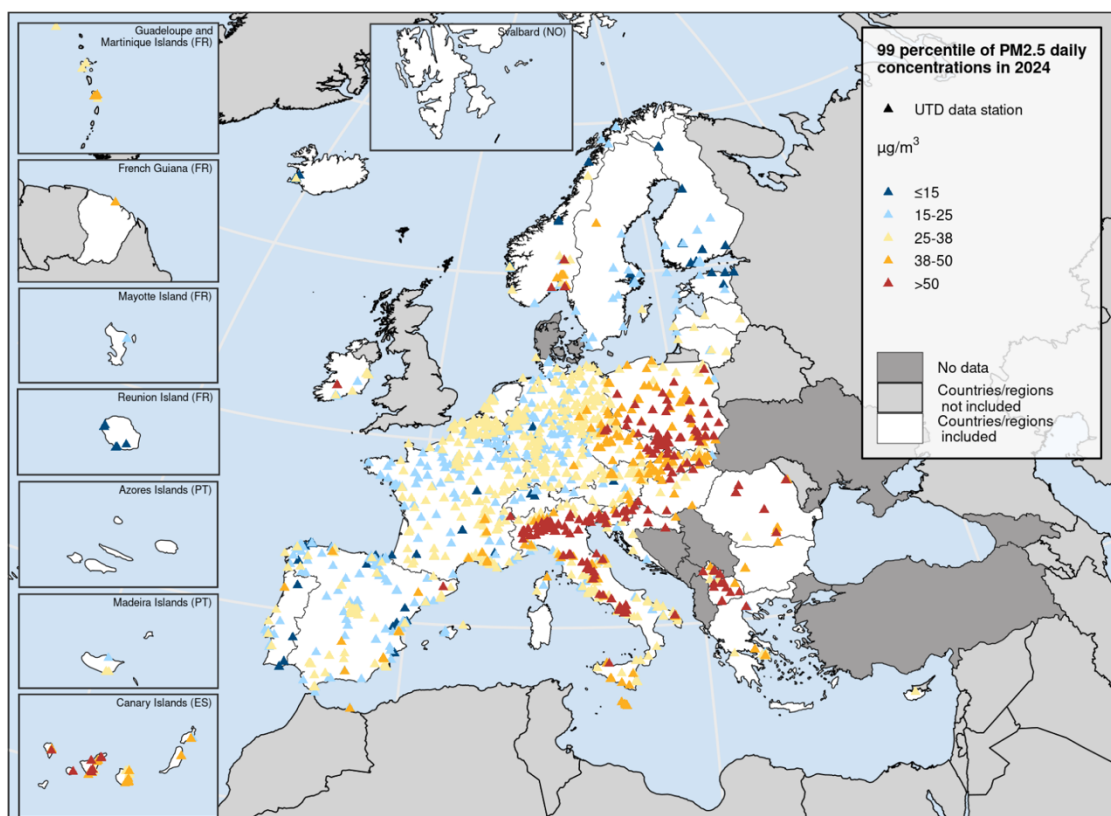
W raporcie opublikowanym przez Komisję Lancet w 2020 roku [39] dotyczącym zapobiegania, interwencji i opieki w demencji, wskazano dwanaście czynników ryzyka choroby Alzheimera i innych form otępienia, na podstawie danych pochodzących z metaanaliz oraz systematycznych przeglądów literatury. Według ustaleń czynniki te mogą odpowiadać nawet za 40% przypadków demencji na świecie, co sugeruje, że niemal połowie zachorowań można by potencjalnie zapobiec lub spowolnić ich rozwój, modyfikując określone ekspozycje środowiskowe i styl życia. Wśród tych czynników znalazły się m.in. choroby współistniejące, takie jak nadciśnienie tętnicze, cukrzyca, otyłość, depresja, urazy mózgu i ubytek słuchu, a także czynniki behawioralne i społeczne, m.in. brak aktywności fizycznej, nadmierne spożycie alkoholu, izolacja społeczna, palenie tytoniu, a ponadto niski poziom wykształcenia skutkujący złym trybem życia oraz ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza [39].

W świetle rosnącej liczby badań wskazujących, że procesy neurodegeneracyjne mogą mieć początek wiele lat przed wystąpieniem objawów klinicznych, szczególnego znaczenia nabiera analiza długofalowego wpływu środowiskowych czynników ryzyka, takich jak ekspozycja na obecne w powietrzu nanocząstki metaliczne.

3.2 Nanocząstki – ich obecność w środowisku oraz działanie biologiczne

Zanieczyszczenie powietrza to istotny problem środowiskowy i zdrowotny, wynikający zarówno z naturalnych procesów, takich jak erupcje wulkaniczne, jak i z działalności człowieka, w tym rozwój przemysłu czy transportu. W jego skład wchodzi różnorodne substancje chemiczne, cząstki stałe (ang. particulate matter, PM) oraz związki biologiczne, które mogą negatywnie wpływać na zdrowie ludzi i innych organizmów. Obecność pierwiastków takich jak miedź (Cu) i cynk (Zn) zaobserwowano w cząstkach o zróżnicowanej wielkości - od nanocząstek (<100 nm) do cząstek o średnicy do 10 μm , co wskazuje na ich pochodzenie z różnych źródeł [40–46].

Analiza składu chemicznego powietrza przeprowadzona w Warszawie w 2016 roku potwierdziła obecność związków zawierających cynk (Zn) i miedź (Cu) w pył zawieszonym PM_{2.5} (cząstki o średnicy nie większej niż 2,5 μm). Ich obecność wiąże się przede wszystkim z emisjami przemysłowymi oraz ruchem drogowym, co wskazuje na wyraźne antropogeniczne pochodzenie tych zanieczyszczeń [47]. Szacuje się też, że ekspozycja na pył zawieszony PM_{2.5} przyczynia się do około 50 000 przedwczesnych zgonów rocznie w Polsce [48,49]. Stężenia frakcji pyłów PM_{2.5} w wielu regionach Europy w 2024 roku nadal przekraczały dzienny poziom zalecany przez Światową Organizację Zdrowia (15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$) [50], co ilustruje rysunek 4.



Rysunek 4. Stężenia frakcji pyłu PM_{2.5} w Europie w 2024 r. (99. percentyl średnich dobowych). Mapa przedstawia liczbę dni z przekroczeniem dziennego poziomu WHO (15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$). Kolorem białym zaznaczono państwa uwzględnione w analizie [50].

Plan działania Komisji Europejskiej na rzecz zerowego zanieczyszczenia powietrza zakłada zmniejszenie wpływu zanieczyszczeń na zdrowie o co najmniej 55% do 2030 roku, w porównaniu do poziomów zanieczyszczeń z 2005 roku [51]. Mimo postępu, w 2022 roku w Unii Europejskiej odnotowano 239 000 przedwczesnych zgonów związanych z ekspozycją na cząstki stałe frakcji PM2.5. Zgodnie z Dyrektywą (UE) 2024/2881 dotyczącą jakości i czystszej powietrza dla Europy, która weszła w życie 10 grudnia 2024 roku, zostały ustalone nowe standardy jakości powietrza, które mają zostać osiągnięte do 1 stycznia 2030 roku. Niemniej jednak zdecydowana większość (94%) populacji miejskiej UE wciąż pozostaje narażona na stężenia frakcji PM2.5 przekraczające poziom wytycznych Światowej Organizacji Zdrowia [52].

W kontekście powyższych danych warto przyjrzeć się wpływowi najmniejszych frakcji cząstek stałych unoszących się w powietrzu na zdrowie człowieka. Bardzo małe cząstki (o rozmiarze <100 nm; ang. ultrafine particles, UFP) zawieszane w powietrzu mogą wpływać na ośrodkowy układ nerwowy (OUN) poprzez osadzanie się na błonie śluzowej jamy nosowo-gardłowej, a następnie przenikać do OUN za pośrednictwem nerwu węchowego, omijając barierę krew-mózg [53]. Szlak nosowo-węchowy jest uważany za jedną z głównych dróg, przez które wdychane nanocząstki mogą dotrzeć do struktur mózgu, w tym hipokampa - obszaru związanego z pamięcią i uczeniem się [54,55].

Nanocząstki (ang. nanoparticles, NPs) ze względu na swoje właściwości fizykochemiczne, takie jak znaczny stosunek powierzchni do objętości, rozpuszczalność, skład chemiczny, rozmiar, kształt oraz tendencję do agregacji, mogą wywoływać szkodliwe skutki na różnych poziomach, począwszy od organów i tkanek, a kończąc na poziomie komórkowym i molekularnym [56–58]. W badaniach na myszach laboratoryjnych wykazano, że duża powierzchnia właściwa oraz wyjątkowo intensywna reaktywność nanocząstek miedzi (Cu NPs) mogą odpowiadać za obserwowaną toksyczność tych struktur [59]. Toksyczność odnotowano również w odniesieniu do tlenków metali ciężkich, takich jak CuO. W badaniach mikrobiologicznych przeprowadzonych na szczepach *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* i *Streptococcus aureus* stwierdzono, że spośród testowanych nanocząstek to właśnie tlenek miedzi (CuO NPs) wykazywał najsilniejsze działanie toksyczne [60]. Nanocząstki tlenku miedzi mają zdolność uwalniania jonów Cu^{2+} do środowiska wodnego, co może przyczyniać się do rozwoju stresu oksydacyjnego i związanego z nim działania toksycznego. Wykazano, że zarówno same CuO NPs, jak i uwalniane przez nie jony Cu^{2+} , istotnie hamują aktywność metaboliczną komórek drożdży *Saccharomyces cerevisiae* [61]. Badania z udziałem organizmu modelowego - nicienia *Caenorhabditis elegans* potwierdziły, że nanocząstki CuO mogą ulegać agregacji i uwalniać jony miedzi, prowadząc do zmian w morfologii komórek nerwowych [62].

Toksyczne działanie miedzi wiąże się przede wszystkim z wywoływaniem stresu oksydacyjnego oraz z uruchamianiem procesów, takich jak ferroptoza [63] - śmierć komórkowa wywołana głównie przez stres oksydacyjny i peroksydację lipidów - oraz

apoptoza [64], czyli programowana śmierć komórki. Obserwowano również, że jony Cu^{2+} mogą zaburzać funkcjonowanie enzymów uczestniczących w przemianach metabolicznych oraz w ochronie przed stresem oksydacyjnym [65]. Jednym z lepiej poznanych mechanizmów toksycznego działania miedzi jest tzw. *kuproptoza* (ang. *cuproptosis*) - forma śmierci komórkowej, do której dochodzi w wyniku nagromadzenia jonów miedzi wewnątrz komórki i zakłócenia funkcjonowania mitochondriów. Szczególnie podatny na te zaburzenia jest kompleks enzymów odpowiedzialnych za przemianę pirogronianu, co może prowadzić do nieprawidłowego działania białek i w efekcie do śmierci komórki [66]. Miedź w postaci nanocząstek Cu/CuO powodowała stres oksydacyjny w komórkach płuc - zarówno zdrowych, jak i nowotworowych - prowadząc do zmniejszenia ich żywotności oraz uszkodzeń genetycznych [67]. Z kolei nanocząstki tlenku miedzi (CuO NPs) obniżały przeżywalność komórek nowotworowych - A549 (ludzka linia raka gruczołowego płuca) oraz MCF-7 (ludzka linia raka piersi) - w sposób zależny od dawki, wykazując jednocześnie silne działanie antyproliferacyjne [68]. W komórkach nabłonka jelitowego szczura zaobserwowano wzrost poziomu nadtlenu wodoru (H_2O_2) oraz spadek zawartości glutationu, co dodatkowo potwierdza udział stresu oksydacyjnego w mechanizmach toksyczności. Co istotne, CuO NPs wykazywały silniejsze działanie toksyczne niż jony miedzi czy inne formy nanocząstek, takie jak Cu_2O -PVP [69]. Warto zaznaczyć, że toksyczność miedzi może również przebiegać niezależnie od obecności reaktywnych form tlenu. W warunkach beztlenowych jony Cu^+ mogą bezpośrednio prowadzić do agregacji białek - szczególnie tych zawierających cysteinę i histydynę - co skutkuje uszkodzeniem struktur komórkowych [70].

Toksyczne działanie nanocząstek tlenków metali nie ogranicza się jednak wyłącznie do układów zawierających miedź. Podobne efekty obserwowano również dla innych metalicznych nanomateriałów, takich jak ZnO, które również mogą wykazywać silne działanie cytotoksyczne. W badaniach na komórkach HaCaT, modelu ludzkich keratynocytów, zaobserwowano ich większą wrażliwość na działanie nanocząstek ZnO w porównaniu do zdrowej skóry [71]. W komórkach raka piersi MCF7, ZnO NPs powodowały spadek przeżywalności komórek w sposób zależny od dawki, osiągając wartość IC50 (stężenie, przy którym połowa komórek przeżywa) wynoszącą 90 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Nanocząstki o rozmiarach od 50 do 80 nm wykazywały silne działanie cytotoksyczne, szczególnie przy wyższych stężeniach [72]. Podobne efekty zaobserwowano w badaniach na komórkach HeLa (rak szyjki macicy), gdzie ZnO NPs wykazywały antyproliferacyjne działanie zależne od dawki [73]. Mniejsze nanocząstki ZnO (20 nm) były bardziej toksyczne w komórkach raka wątroby HepG2, a uwolnienie jonów Zn^{2+} odgrywało kluczową rolę w wywoływaniu stresu oksydacyjnego, co prowadziło do nekrozy - śmierci komórki wskutek uszkodzenia jej struktury [74]. W komórkach GC-1 (pochodzących z nabłonka siatkówki) efekty cytotoksyczne były zależne od dawki i czasu ekspozycji - wyższe stężenia powodowały uszkodzenia DNA mediowane przez ROS oraz znaczne uszkodzenia komórek, podczas gdy mniejsze stężenia i krótszy czas ekspozycji miały minimalny wpływ [75]. Nanocząstki ZnO wykazywały również selektywną toksyczność względem komórek nowotworowych, takich jak Caco-2 (komórki ludzkiego nabłonka jelitowego) i A549 (komórki ludzkiego raka płuc), przy znacznie mniejszej toksyczności

dla komórek zdrowych, takich jak WI38 (komórki fibroblastów ludzkich) [76]. W komórkach HepG2 mniejsze cząstki ZnO (~15–20 nm) indukowały apoptozę oraz stres oksydacyjny, podczas gdy większe (~100 nm) miały mniejszą cytotoksyczność [77].

W ostatnich latach coraz więcej uwagi poświęca się roli metali w mechanizmach prowadzących do neurodegeneracji. Szczególnie istotne wydają się jony miedzi (Cu^{2+}), cynku (Zn^{2+}) i żelaza (Fe^{3+}). Miedź i żelazo zidentyfikowano jako czynniki nasilające patologiczne procesy agregacji białek α -synukleiny oraz tau - kluczowych elementów zaangażowanych w rozwój choroby Parkinsona i choroby Alzheimera. Obecność tych metali sprzyja powstawaniu cytotoksycznych form tych białek, co przekłada się na znaczący spadek żywotności komórek nerwowych SH-SY5Y potwierdzając ich potencjalny udział w progresji zaburzeń neurodegeneracyjnych [78]. SH-SY5Y to ludzka linia komórkowa wykorzystywana jako model neuronów dopaminergicznych w badaniach nad neurodegeneracją. W przypadku białka tau, szczególną uwagę zwraca cynk (Zn^{2+}), który nie tylko przyspiesza proces fibrylizacji-skracając czas potrzebny do uzyskania 50% fibryl z 15 do zaledwie 6 godzin - ale także promuje przejście jego struktury w bardziej stabilną, lecz toksyczną konformację β -harmonijkową. Efektem tych zmian jest wzrost produkcji reaktywnych form tlenu oraz pogorszenie stanu morfologicznego i przeżywalności neuronów [79,80]. W szczególności nanocząstki tlenku miedzi wykazują zdolność do uszkodzania komórek SH-SY5Y m.in. poprzez aktywację odpowiedzi autofagicznej oraz wpływ na mitochondrialne szlaki regulacyjne, co może odgrywać rolę w mechanizmach neurodegeneracyjnych [81]. W przypadku nanocząstek tlenku cynku wykazano, że ich toksyczność zależy zarówno od stężenia, jak i od rozmiaru. Niskie dawki (do 25 $\mu\text{g/ml}$) mogą działać ochronnie na komórki nerwowe, jednak w wyższych stężeniach ($\geq 50 \mu\text{g/ml}$) obserwowano wyraźny spadek przeżywalności komórek oraz wzmożoną produkcję ROS [82]. Co istotne, mniejsze nanocząstki ZnO (o średnicy około 18,5 nm) okazały się znacznie bardziej toksyczne niż ich większe odpowiedniki (47,1 nm), co potwierdza znaczenie rozmiaru nanocząstek w ich działaniu cytotoksycznym [83]. Podobnie, bezpośrednia ekspozycja komórek SH-SY5Y na rosnące stężenia jonów Cu^{2+} (w zakresie 50–400 μM) prowadziła do stopniowego spadku ich żywotności. Towarzyszyły temu intensywne procesy apoptozy i nekrozy, wzrost poziomu ROS oraz depolaryzacja błony mitochondrialnej - jeden z kluczowych sygnałów świadczących o stresie oksydacyjnym i neurotoksyczności [84]. W innych badaniach wykazano, że linie komórkowe SH-SY5Y reagują na CuO NPs w sposób zależny od stężenia, co przejawia się wzrostem poziomu ROS, aktywacją szlaków apoptotycznych oraz zwiększoną produkcją β -amyloidu. Wyniki te sugerują możliwy związek między ekspozycją na nanocząstki miedzi a ryzykiem rozwoju choroby Alzheimera [85].

Chociaż powyższe dane pochodzą z badań *in vitro*, ich znaczenie nabiera dodatkowego wymiaru w świetle badań epidemiologicznych. Coraz więcej dowodów wskazuje na istnienie korelacji pomiędzy zanieczyszczeniem powietrza a zwiększonym ryzykiem wystąpienia demencji. Coraz liczniejsze dane naukowe wskazują na istotny związek między ekspozycją na zanieczyszczenia powietrza a ryzykiem rozwoju choroby

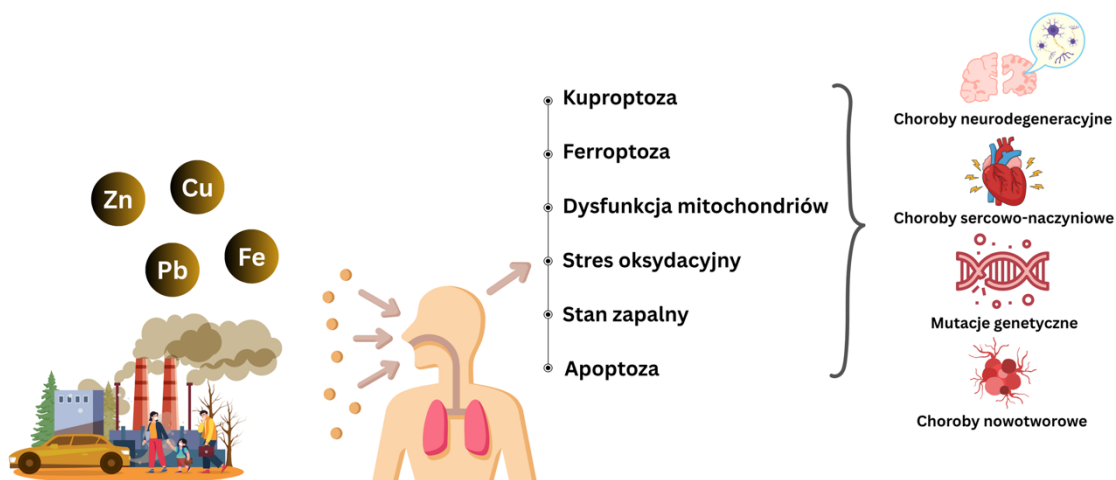
Alzheimera oraz innych form otępienia [86–89]. Wykazano także dodatnią korelację pomiędzy narażeniem na pył zawieszony z frakcji PM2.5 a ryzykiem wystąpienia otępienia o różnym podłożu [90–97]. Potwierdzono statystycznie istotny związek pomiędzy ekspozycją na PM2.5 a ryzykiem rozwoju otępienia, w tym choroby Alzheimera oraz łagodnych zaburzeń poznawczych. Co istotne, wpływ ten nie był znacząco modyfikowany przez indywidualne predyspozycje genetyczne, co sugeruje, że zanieczyszczenia powietrza stanowią niezależny czynnik ryzyka rozwoju otępienia [98]. Długoterminowe narażenie na te zanieczyszczenia powietrza wiązało się także z nasileniem zmian strukturalnych w mózgu charakterystycznych dla AD. Zmiany te obejmowały m.in. odkładanie się amyloidu oraz zanik kory mózgowej, oceniane za pomocą pozytonowej tomografii emisyjnej (ang. positron emission tomography, PET) i rezonansu magnetycznego (ang. magnetic resonance imaging, MRI) [99–102].

Zaobserwowano, że długoterminowa ekspozycja na wyższe stężenia PM2.5 wiązała się ze zwiększonym poziomem biomarkerów patologii amyloidowej, takich jak peptydy $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-42}$ oraz ze wzrostem stosunku $A\beta_{1-42}$ do $A\beta_{1-40}$, co może świadczyć o nasilonym odkładaniu złogów amyloidu β w mózgu [103]. Inne badania wykazały, że długotrwała ekspozycja na zanieczyszczenia powietrza, zwłaszcza pył zawieszony PM2.5, była istotnie związana ze spadkiem stężenia $A\beta_{1-42}$ w płynie mózgowo-rdzeniowym (ang. cerebrospinal fluid, CSF), co może świadczyć o nasilonym odkładaniu się blaszek amyloidowych w mózgu, a tym samym - o zwiększonym ryzyku rozwoju choroby Alzheimera [104].

W niektórych badaniach pośmiertnych odnotowano również zwiększoną obecność zmian neuropatologicznych, takich jak hiperfosforylowane białko tau, złogi amyloidu β oraz aktywację komórek glejowych w hipokampie, korze mózgowej i opuszcze węchowej - zarówno u osób młodych, jak i starszych - które przez dłuższy czas zamieszkiwały tereny o wysokim stopniu zanieczyszczenia powietrza [105–107].

Doniesienia z badań przeprowadzanych w warunkach silnego zanieczyszczenia miejskiego ujawniają obecność patologicznych form białek neurodegeneracyjnych - w tym hiperfosforylowanego białka tau, β -amyloidu, α -synukleiny i TDP-43 - już u dzieci i młodych dorosłych [107,108]. W badaniach tych stwierdzono obecność nanocząstek metali oraz związków pochodzących z emisji spalin w tkance nerwowej, co wskazuje na możliwość trwałego odkładania się tych cząstek w mózgu w następstwie przewlekłej ekspozycji środowiskowej [107]. Dane te budzą szczególne zaniepokojenie w świetle stwierdzanych jednocześnie objawów neurozapalnych, zaburzeń funkcji poznawczych oraz deficytów emocjonalno-behawioralnych u dzieci narażonych na UFP [107,108]. Eksperymenty przeprowadzone na zwierzętach z indukowanym modelem choroby Alzheimera wskazują, że już krótkotrwała ekspozycja na UFP prowadzi do zaburzeń morfologii mikrogleju, zmian ekspresji cytokin zapalnych oraz zwiększenia poziomu patologicznie fosforylowanego białka tau, przy jednoczesnym zmniejszeniu liczby blaszek amyloidowych [109]. Dane te sugerują złożony wpływ UFP na procesy

neurodegeneracyjne, potencjalnie poprzez indukcję odpowiedzi zapalnej i stresu oksydacyjnego oraz zaburzenia procesów autofagii [108–110].



Rysunek 5. Wpływ metali ciężkich i zanieczyszczeń powietrza na organizm człowieka - mechanizmy uszkodzeń komórkowych i potencjalne konsekwencje zdrowotne.

Na poziomie populacyjnym, badanie z udziałem około 21 milionów osób starszych w USA wykazało, że długotrwała ekspozycja na podwyższone stężenia UFP istotnie zwiększała ryzyko rozwoju choroby Alzheimera i innych form otępienia. Zależność ta była silniejsza u osób z chorobami współistniejącymi, takimi jak nadciśnienie czy cukrzyca, co może wskazywać na rolę UFP jako czynnika wzmacniającego istniejące procesy patofizjologiczne [111]. Pomimo rosnącej liczby danych naukowych, UFP wciąż pozostają poza zakresem większości norm dotyczących jakości powietrza. W kontekście postępującego procesu urbanizacji i wzrostu liczby ludności narażonej na zanieczyszczenia komunikacyjne, naukowcy apelują o pilne włączenie bardzo małych cząstek do regulacji środowiskowych oraz wdrożenie systematycznego monitoringu ich stężenia w atmosferze [107,108,111,112]. Obserwowane w ostatnich dekadach zmniejszenie poziomu frakcji PM_{2.5} nie znajduje odzwierciedlenia w przypadku UFP, co budzi obawy o rzeczywisty zakres ochrony zdrowia publicznego [112,113].

Podsumowując, jak zilustrowano na rysunku 5, nanocząstki, takie jak tlenki miedzi (CuO) i cynku (ZnO), wykazują istotne działanie toksyczne, m.in. poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, apoptozy, ferroptozy oraz kuproptozy. Te procesy prowadzą do uszkodzeń komórek, w tym neuronów, co może sprzyjać rozwojowi chorób neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera czy Parkinsona. Wyniki licznych badań *in vitro* wskazują, że toksyczność nanocząstek silnie zależy od ich rozmiaru, stężenia oraz właściwości powierzchniowych. Szczególną uwagę zwraca ich zdolność do zaburzania homeostazy metali w komórkach nerwowych, jak również do promowania patologicznej agregacji białek, takich jak białko tau i peptydy β -amyloidu. Obserwacje te podkreślają pilną potrzebę kontynuowania badań nad mechanizmami działania nanocząstek w organizmach żywych oraz nad ich wpływem na zdrowie publiczne. W kontekście rosnącego zanieczyszczenia powietrza i obecności nanomateriałów w

środowisku, kluczowe staje się zrozumienie ich roli w procesach neurotoksyczności i neurodegeneracji, a także ich potencjalnego udziału w patogenezie otępienia. Szczególnie istotne wydaje się dalsze badanie interakcji nanocząstek z białkami amyloidogennymi oraz ich wpływu na mechanizmy komórkowe, które mogą prowadzić do trwałych zmian strukturalnych i funkcjonalnych w obrębie mózgu.

Przedstawione powyżej podsumowanie wpływu nanocząstek i jonów metali pozwala nakreślić złożoną sieć zależności towarzyszących procesom amyloidogenezy oraz rozwoju chorób neurodegeneracyjnych. W dalszej części pracy skupię się na szczegółowym omówieniu białka wybranego jako model badawczy - ludzkiej cystatyny C, która również odgrywa istotną rolę w procesach amyloidogenezy.

3.3 Ludzka cystatyna C

3.3.1 Struktura i funkcja cystatyny C

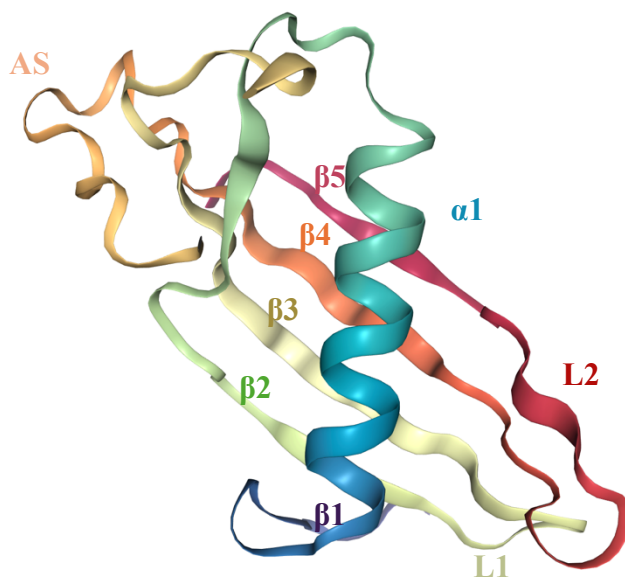
W 1961 roku Jorgen Clausen po raz pierwszy opisał białko obecne w ludzkim płynie mózgowo-rdzeniowym, które nazwał „białkiem specyficznym dla płynu mózgowo-rdzeniowego” γ -CSF. Odkrycie tego białka za pomocą immunoelektroforezy, przy użyciu przeciwciał skierowanych zarówno przeciwko białkom surowicy, jak i specyficznym komponentom płynu mózgowo-rdzeniowego, umożliwiło wskazanie makrocząsteczki, którą później zidentyfikowano jako cystatynę C [114].

Nazwa „cystatyna” została po raz pierwszy zaproponowana przez Alana J. Barretta w 1981 roku w celu opisanego małego białka izolowanego z białka jaja kurzego, które wykazywało zdolność hamowania aktywności lizosomalnych proteaz cysteinowych [115]. Podczas konferencji „First International Symposium on Cysteine Proteinases and Their Inhibitors” (Portoroz, Croatia, 1985) uzgodniono, że wszystkie białka zdolne do modulowania i inhibicji proteaz cysteinowych, mające ewolucyjne powiązania z kurzą cystatyną, będą tworzyć nadrodzinę cystatyn [116]. Członkowie tej nadrodziny zostali po raz pierwszy podzieleni na trzy rodziny, na podstawie lokalizacji komórkowej, rozmiaru oraz złożoności łańcucha polipeptydowego [117]. Na przestrzeni lat nadrodzina cystatyn była stopniowo rozszerzana [118]. Zgodnie z kryterium podobieństwa sekwencji, białka wykazujące wystarczające podobieństwo w swojej strukturze, uznawane są za członków tej samej rodziny. Rodzina cystatyn typu 2, największa spośród wszystkich, zawiera ludzką cystatynę C [116]. Cystatyny typu 2 mają masę cząsteczkową w zakresie 13–14 kDa, zazwyczaj składają się z około 120–125 reszt aminokwasowych i zawierają cztery reszty cysteiny, które uczestniczą w tworzeniu dwóch mostków dwusiarczkowych, charakterystycznych dla tej rodziny [119,120].

Ludzka cystatyna C (ang. human cystatin C - HCC) to małe białko o masie cząsteczkowej 13 335 Da, zbudowane z pojedynczego łańcucha polipeptydowego składającego się ze 120 reszt aminokwasowych. Całkowita sekwencja aminokwasowa HCC została ostatecznie określona w 1981 roku przez Andersa Grubba i Helge Löfberga, którzy wykazali również obecność tego białka w przednim płacie przysadki mózgowej u małp oraz ludzi [121]. Anders Grubb, jako jeden z głównych badaczy cystatyny C, przyczynił się nie tylko do jej szczegółowego opisanie, ale także do głębszego zrozumienia jej funkcji. Jego badania mają szczególne znaczenie, zwłaszcza w kontekście roli cystatyny C jako biomarkera w diagnostyce wielu chorób.

Kolejnym istotnym elementem jest przedstawienie budowy molekularnej HCC. W części C-końcowej cząsteczki znajdują się cztery reszty cysteinowe, tworzące dwie pary: Cys73–Cys83 oraz Cys97–Cys117, formujące dwa mostki dwusiarczkowe, stabilizujące strukturę cystatyny. W warunkach fizjologicznych monomeryczna forma HCC działa jako silny inhibitor proteaz cysteinowych z rodzin papain i legumain [122,123]. Epitop odpowiedzialny za hamowanie proteaz papainowych obejmuje trzy elementy zlokalizowane na jednej z krawędzi cząsteczki: N-końcowy fragment oraz dwie pętle

oznaczone jako L1 i L2 [124]. Pętle te są częścią dużego, wygiętego arkusza β , składającego się z pięciu antyrównoległych nici. W strukturze tej obecna jest również długa helisa $\alpha 1$, ustawiona niemal prostopadle do kierunku nici β . Cała struktura jest zorganizowana w następującej kolejności: (N)- $\beta 1$ - $\alpha 1$ - $\beta 2$ -L1- $\beta 3$ -AS- $\beta 4$ -L2- $\beta 5$ -(C), gdzie AS (ang. appending structure) to szeroka „struktura dołączona”, zawierająca epitop odpowiedzialny za inhibicję proteaz cysteinowych z rodziny legumain [123]. Trójwymiarowa struktura monomeru HCC uzyskana dzięki badaniom krystalograficznym została przedstawiona na rysunku 6.



Rysunek 6. Struktura przestrzenna cystatyny C (PDB: 3GAX) [125], pokazująca kluczowe elementy strukturalne, takie jak β -arkusze i α -helisa. Wizualizacja wykonana przy użyciu narzędzi programistycznych w języku Python.

Pomimo, że początkowo ludzka cystatyna C została zidentyfikowana w płynie mózgowo-rdzeniowym, później stwierdzono także jej obecność we wszystkich innych płynach ustrojowych człowieka [126]. Najwyższe stężenie cystatyny C stwierdzono w tkance mózgowej [127], gdzie jest produkowana przez neurony, astrocyty oraz komórki mikrogleju [128–130]. Stężenie cystatyny C w płynie mózgowo-rdzeniowym jest fizjologicznie podwyższone, co sugeruje jej istotną rolę ochronną w obrębie ośrodkowego układu nerwowego [131]. Typowe stężenie tego białka w płynie mózgowo-rdzeniowym wynosi około 5,8 mg/l, co stanowi wartość 5–6 razy wyższą niż w osoczu [132–134].

Cystatyna C jako inhibitor proteaz wykazuje aktywność przeciwwirusową i przeciwbakteryjną, uczestniczy również w regulacji resorpcji kości oraz proliferacji komórek. Jej stężenie zmienia się w przebiegu licznych chorób, m.in. przewlekłej choroby nerek, nadciśnienia, infekcji układu moczowego, chorób autoimmunologicznych, sercowo-naczyniowych oraz w procesach starzenia się

organizmu [135]. Dzięki stałej biosyntezie w komórkach jądrzastych i niezależności od masy mięśniowej, HCC uznawana jest za wiarygodny marker przesączania kłębuszkowego (GFR), z powodzeniem stosowany, niezależnie od oznaczeń poziomu kreatyniny, w ocenie funkcji nerek i monitorowaniu zakażeń układu moczowego [136,137]. Coraz więcej danych wskazuje również na diagnostyczną przydatność cystatyny C w innych jednostkach chorobowych, szczególnie w zakresie układu sercowo-naczyniowego, takich jak miażdżyca, tętniaki naczyniowe czy hiperhomocysteinemia [138–141], a także w przewlekłych stanach zapalnych [140,142] oraz chorobach nowotworowych [143–146]. Badania *in vitro* wskazują, że w stanach zapalnych dochodzi do zmniejszenia wydzielania cystatyny C przez monocyty i makrofagi. Skutkuje to zaburzeniami w tkankach, spowodowanymi wzrostem aktywności proteaz cysteinowych, które mogą prowadzić do patologicznych zmian [147]. Zmieniona ekspresja cystatyny C została zaobserwowana także w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Alzheimera (AD) [148–151], stwardnienie zanikowe boczne (ALS) [151,152], choroba Parkinsona (PD) [151,153] oraz w przypadku epilepsji [154,155]. Monitorowanie jej poziomu jest pomocne w ocenie zaawansowania choroby oraz skuteczności terapii, co czyni ją ważnym biomarkerem w medycynie.

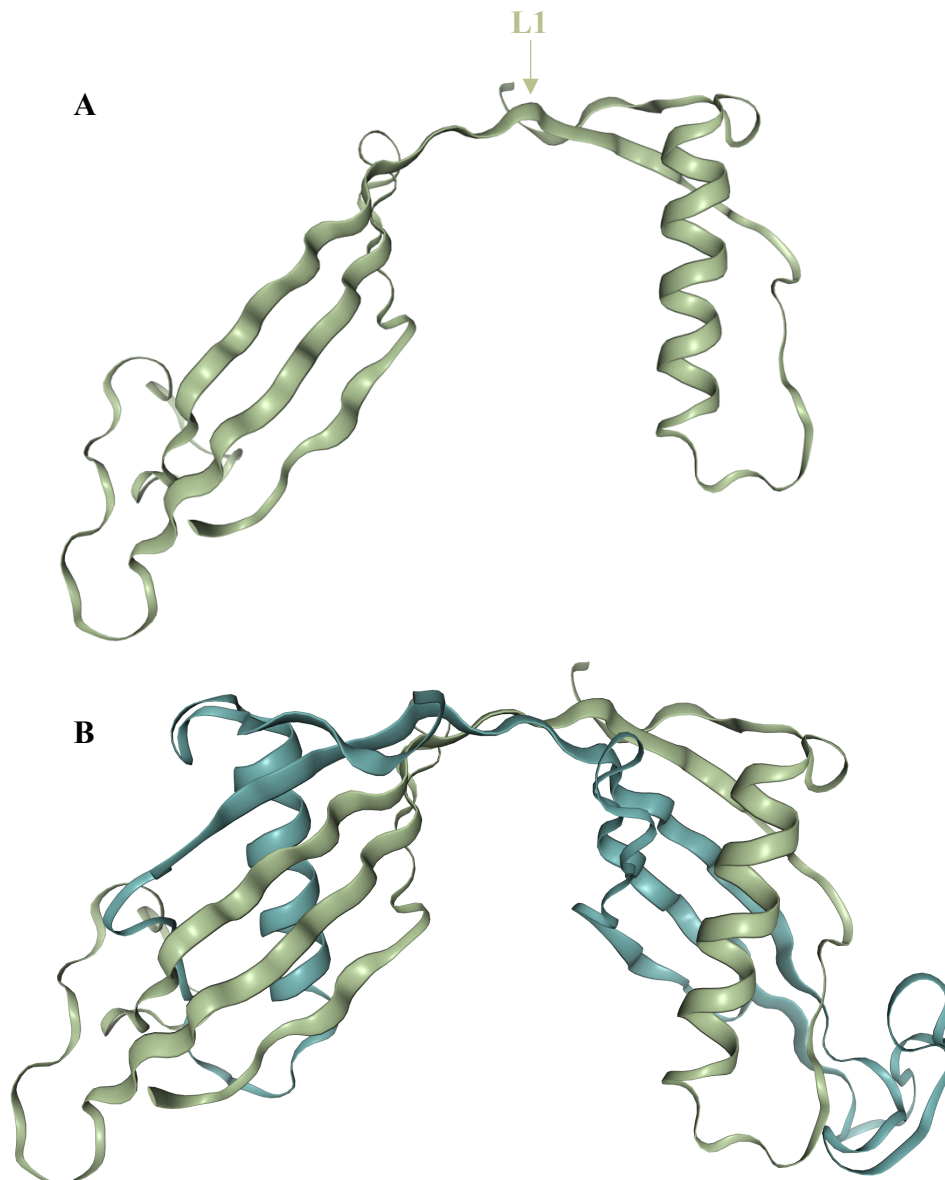
3.3.2 Cystatyna C jako białko amyloidogenne

W swojej fizjologicznie aktywnej formie ludzka cystatyna C funkcjonuje jako monomer [156], choć jej zdolność do oligomeryzacji poprzez zjawisko wymiany domen została dobrze udokumentowana [157]. Trójwymiarowa wymiana domen (ang. 3D domain swapping) jako mechanizm wymaga częściowego rozwinięcia monomeru, a następnie rozdzielenia wymienianych domen, co prowadzi do rekombinacji i utworzenia dimeru i dalej oligomeru [158,159].

Zakłada się, że białka zdolne do wymiany domen posiadają wspólne cechy strukturalne. Przykładem są tzw. pętle zawiasowe, charakteryzujące się niekorzystnymi wartościami kątów torsyjnymi skrętu lub zawierające określone reszty aminokwasowe. W przypadku HCC pętla L1 (reszty Q⁵⁵IVAG⁵⁹) odgrywa kluczową rolę w dimeryzacji cystatyny C, łącząc fragmenty wymieniane w procesie zamiany domen: fragment N-końcowy β 1- α - β 2 oraz część C-końcową β 3-AS- β 4-L2- β 5. Jest to jedyny element strukturalny, który ulega istotnym zmianom w trakcie wymiany domen, przechodząc z konformacji zgiętej w rozszerzoną (rysunek 7A). Takie właściwości czynią z pętli L1 modelowy przykład tzw. „regionu zawiasowego”. Napięcia konformacyjne w tym rejonie są szczególnie skoncentrowane w walinie 57, znajdującej się w pobliżu wierzchołka zakrętu [157,160].

Analiza struktury ludzkiej cystatyny C metodą krystalografii rentgenowskiej ujawnia, że białko to, w wyniku trójwymiarowej wymiany domen, przekształca się w zwartą, symetryczną strukturę dimeru, zachowując jednocześnie drugorzędową organizację charakterystyczną dla formy monomerycznej [157,161]. Powstałe dimery mogą przyjmować zarówno konformację otwartą [162], jak i częściowo zamkniętą

[157,163] . Zanik pętli L1 w strukturze dimeru oraz związane z tym zaburzenie tego funkcjonalnego elementu białka potwierdzają, że dimery HCC nie wykazują zdolności do inhibicji proteazy typu C1 [163]. Poza strukturami dimerowymi, opracowano także model trimeru ludzkiej cystatyny C, którego formowanie zachodzi poprzez ten sam mechanizm trójwymiarowej wymiany domen [164]. Natomiast zgodnie z naszymi wcześniejszymi badaniami, tetrameryczne formy HCC powstają przez połączenie dimerów bez udziału tego mechanizmu [165]. Forma dimeryczna HCC z wymianą domen została przedstawiona na rysunku 7B.



Rysunek 7. Dimeryczna struktura przestrzenna ludzkiej cystatyny C z wymianą domen. A) Izolowany ze struktury dimeru pojedynczy monomer z rozciągniętą pętlą L1, kluczową dla procesu dimeryzacji. B) Struktura dimeru formy regularnej HCC, powstająca przez wymianę domen. PDB:1G96[157]. Poszczególne monomery w dimerze wyróżniono kolorami zielonym i niebieskim. Wizualizacja wykonana przy użyciu narzędzi programistycznych w języku Python.

Struktura przestrzenna monomerycznej formy cząsteczki typu dzikiego (ang. wild type, wt) nie została dotąd określona, ponieważ wszelkie próby krystalizacji tej formy prowadziły do powstania struktury dimeru. Struktury monomerów uzyskano natomiast dla punktowych mutantów w obrębie pętli zawiasowej, które chronią cząsteczkę przed wymianą domen - dla wariantu, w którym walina w pozycji 57 została zamieniona na glicynę (V57G) [166], oraz w przypadku zamiany waliny na asparaginę (V57N) [167]. Monomeryczną formę cystatyny C uzyskano również w wariacie HCC stab1, który dzięki podwójnej mutacji i wprowadzeniu dwóch cystein (Leu47Cys i Gly69Cys) uformowane zostało dodatkowe wewnątrzcząsteczkowe wiązanie disiarczkowe [168].

Mechanizm powstawania oligomerów i fibryli HCC pozostaje nadal nie do końca wyjaśniony. Pomimo licznych badań prowadzonych przy użyciu podobnych metod, różne grupy badawcze dochodziły do odmiennych wniosków, uznając wymianę domen za niezależny czynnik w tworzeniu fibryli. Perlenfein i wsp. wykazali, że mutacja V57N, stabilizująca HCC przeciwko wymianie domen, wciąż prowadzi do formowania fibryli. Sugeruje to, że wymiana domen nie jest konieczna do procesu fibrylizacji [169]. Z kolei inna grupa badawcza uznała wymianę domen za kluczowy mechanizm tworzenia fibryli. Wahlbom i współpracownicy opisali tworzenie oligomerów przez dziki typ HCC po inkubacji monomerycznych frakcji HCC. Sugerowali, że trójwymiarowa wymiana domen odgrywa w tym procesie zasadniczą rolę, postulując, że wyższe struktury HCC powstają wskutek propagowanej wymiany domen, a nie przez proste formowanie dimerów [170].

Tsiolaki i wsp., wykorzystując algorytm AMYLPRED, zidentyfikowali trzy fragmenty HCC o wysokim potencjale agregacyjnym: ⁴⁷LQVVR⁵¹, ⁵⁶IVAGVNYFLD⁶⁵ oraz ⁹⁵AFCSFQIYAVP¹⁰⁵. Zdolność tych sekwencji do samoorganizacji potwierdzono eksperymentalnie, co wskazuje, że mogą one pełnić istotną rolę w inicjowaniu procesu agregacji i tworzeniu struktur amyloidowych [171,172].

Wymiana domen sprzyja dimeryzacji cystatyny C, prowadząc do utraty jej aktywności inhibitora proteaz. Ten sam mechanizm może inicjować agregację białka i powstawanie struktur amyloidowych, odgrywających istotną rolę w patogenezie mózgowej angiopatii amyloidowej związanej z cystatyną C.

3.3.3 Cystatyna C i amyloidoza

Amyloidogenny charakter cystatyny C jest wynikiem mutacji punktowej L68Q, w której leucyna w pozycji 68 zostaje zastąpiona przez glutaminę [173]. W warunkach *in vitro* wariant L68Q wykazuje znacznie zwiększoną tendencję do dimeryzacji i agregacji [174,175], co prowadzi do masowego odkładania amyloidowych złogów białka w tętnicach mózgu oraz rozwoju śmiertelnej choroby - dziedzicznej angiopatii amyloidowej cystatyny C (HCCAA) [176,177], której przypadki opisano niemal wyłącznie w populacji islandzkiej. Substytucja Leu68 → Gln prowadzi do zmian w strukturze białka, które sprzyjają jego agregacji i odkładaniu się amyloidu w mózgowych naczyniach

krwionośnych, co powoduje ich uszkodzenie i może prowadzić do krwotoków. Choroba zazwyczaj ujawnia się przed 40. rokiem życia, najczęściej w postaci krwotoków śródmózgowych o ciężkim przebiegu, które często kończą się śmiercią. Na wczesnym etapie mogą pojawić się objawy neurodegeneracyjne, takie jak demencja i zmiany osobowości [178,179]. Złogi amyloidowe składają się głównie ze skróconych form cystatyny C, pozbawionych pierwszych 10 aminokwasów, co może wynikać z działania elastazy neutrofilowej [180]. U heterozygotycznych pacjentów z HCCAA obecne są zarówno dzika forma cystatyny C, jak i wariant L68Q. Analiza wykazała obecność obu form w osoczu, ale nie stwierdzono L68Q w płynie mózgowo-rdzeniowym [181]. W badaniach CSF pacjentów z HCCAA zaobserwowano obecność dimerycznych i monomerycznych form cystatyny C, przy czym dimery były w mniejszych ilościach. Różnica w stężeniu L68Q między osoczem a CSF może wynikać z większej stabilności dimerycznej formy L68Q w osoczu oraz obecności proteazy serynowej w CSF, która skutecznie degraduje dimery L68Q, ale nie dziką formę cystatyny C [182]. Powstałe formy amyloidowe odkładają się nie tylko w obrębie naczyń mózgowych, ale także w innych tkankach, takich jak skóra, gruczoły ślinowe, węzły chłonne, śledziona i pęcherzyki nasienne [183].

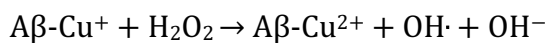
3.4 Rola miedzi i cynku w chorobach neurodegeneracyjnych

Miedź i cynk to pierwiastki śladowe (mikroelementy) pełniące istotne funkcje w utrzymaniu homeostazy organizmu, w tym prawidłowego funkcjonowania układu nerwowego [184]. Jednak coraz więcej badań wskazuje na to, że zaburzenia ich homeostazy mogą mieć związek z rozwojem chorób neurodegeneracyjnych [185]. W schorzeniach takich jak choroba Alzheimera czy choroba Parkinsona wykazano obecność podwyższonych stężeń miedzi i cynku w obrębie patologicznych agregatów białkowych - odpowiednio β -amyloidu i α -synukleiny [186–192]. Jony tych metali mają zdolność wiązania się z określonymi regionami tych białek, co wpływa na ich konformację i sprzyja tworzeniu się toksycznych złogów w mózgu.

Badania wykazały, że obecność jonów miedzi (Cu^{2+}) znacznie zwiększa siłę wiązania między cząsteczkami $\text{A}\beta$, co skutkuje redukcją czasu latencji agregacji poprzez stabilizację kompleksów $\text{A}\beta$ - $\text{A}\beta$ już na poziomie pojedynczych cząsteczek [186]. Dodatkowo, miedź może być wbudowywana zarówno na etapie formowania włókien amyloidowych α -synukleiny, jak i po ich uformowaniu, wpływając przy tym na ich strukturę oraz właściwości chemiczne, w tym zdolność do udziału w reakcjach redoks [189]. Zaobserwowano, że miedź wiąże się z N-końcowym regionem α -synukleiny oraz z resztą histydynową His50, co sprzyja nieprawidłowemu fałdowaniu białka i formowaniu stabilnych struktur β -karkowych, które mogą inicjować tworzenie ciał Lewy'ego, obecnych u pacjentów z chorobą Parkinsona [188,192].

W przypadku cynku zaobserwowano, że jony Zn^{2+} promują fibrilizację α -synukleiny *in vitro*, choć jego powinowactwo do tego białka jest relatywnie niskie w porównaniu do innych amyloidogennych peptydów, takich jak $\text{A}\beta$, co rodzi wątpliwości dotyczące jego istotnej roli biologicznej w patogenezie PD [187]. W kontekście choroby Alzheimera, cynk wiąże się z $\text{A}\beta$, prowadząc do formowania toksycznych, sferycznych oligomerów o odmiennych właściwościach strukturalnych i biologicznych w porównaniu do klasycznych agregatów $\text{A}\beta$. Oligomery $\text{A}\beta$ indukowane przez jony cynku wykazują silną cytotoksyczność oraz zdolność do wywoływania reakcji zapalnych w hipokampie, co sugeruje ich potencjalny udział w neurodegeneracji [190].

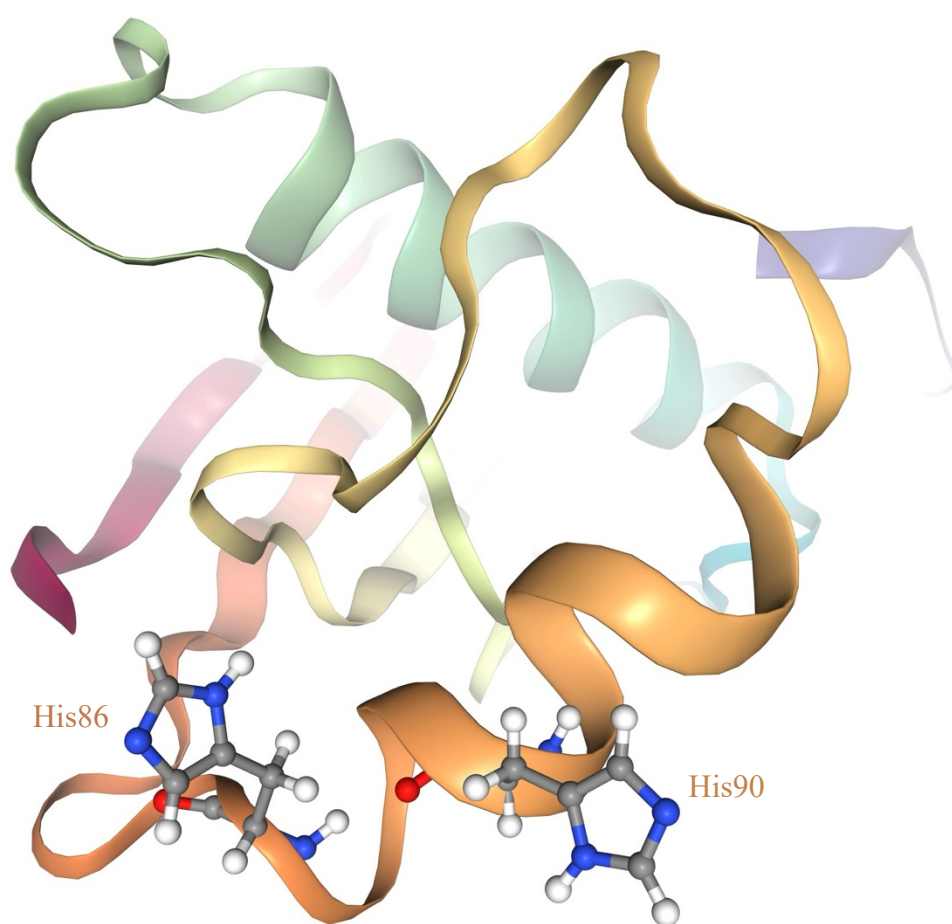
Zarówno miedź, jak i cynk mogą również uczestniczyć w generowaniu reaktywnych form tlenu w wyniku interakcji z $\text{A}\beta$, co dodatkowo nasila uszkodzenia neuronalne [191]. W tym procesie kompleksy metal-białko, takie jak $\text{A}\beta$ - Cu^+ , biorą udział w reakcji Fentona, w której utlenienie miedzi prowadzi do powstawania ROS, nasilających stres oksydacyjny i neurotoksyczność. Generowanie wolnych rodników zachodzi głównie na drodze reakcji redoks aktywnego kompleksu metal-białko, a nie wolnego metalu [193]:



Amyloid β wiąże jony miedzi głównie w N-końcowym fragmencie peptydu (reszty 1–16), gdzie koordynację zapewniają pierścienie imidazolowe histydyń w pozycjach 6, 13

i 14 oraz grupa aminowa na N-końcu. Kluczową rolę odgrywa His13 - jej brak w amyloidzie szczurzym wyjaśnia mniejszą zdolność do agregacji oraz brak patologii charakterystycznych dla choroby Alzheimera, co wskazuje na niezbędną rolę His13 w procesie agregacji amyloidu β [193].

Ludzka cystatyna C, wykazująca zdolność do wiązania amyloidu β oraz hamowania jego agregacji [194], również wykazuje zdolność do wiązania miedzi. Badania wykazały, że fragment C-końcowy, zawierający reszty histydyny (His86 i His90), jest w stanie efektywnie wiązać jony Cu^{2+} [195,196]. Pokazano, że His90 pełni rolę głównego punktu kotwiczenia jonu miedzi w białku, podczas gdy His86 może przejmować tę funkcję w obecności innych ligandów Cu(II) , tworząc kompleksy trójskładnikowe. Badania sugerują, że jony Cu(II) mogą wspierać interakcje HCC z innymi biomolekułami zawierającymi dostępne miejsca wiązania Cu(II) , co może prowadzić do tworzenia stabilnych kompleksów trójskładnikowych, w tym z amyloidem β [197]. Na rysunku 8 przedstawiono strukturę przestrzenną ludzkiej cystatyny C (mutant V57G) z uwidocznionymi resztami histydyny w pozycjach 86 i 90.



Rysunek 8. Struktura przestrzenna fragmentu ludzkiej cystatyny C określona metodą spektroskopii NMR, z widocznymi resztami histydyny w pozycjach 86 i 90 (His86 i His90) (kod PDB: 6RPV) [166]. Wizualizacja wykonana przy użyciu narzędzi programistycznych w języku Python.

3.5 Rola przepływu w układzie naczyniowym na procesy agregacji białek

W ostatnich latach badania nad wpływem czynników mechanicznych, takich jak naprężenia ścinające oraz przepływy mikrofluidyczne, zyskują na znaczeniu w kontekście procesów agregacji białek związanych z chorobami neurodegeneracyjnymi. W literaturze podkreśla się, że naprężenia mechaniczne w organizmach żywych mają znaczący wpływ na stabilność białek, sprzyjając ich agregacji [198]. Wykazano, że zmienne warunki przepływu w wąskich kanałach płynów mózgowo-rdzeniowego i śródmiąższowego mogą wpływać na strukturę amyloidu β oraz innych białek, sprzyjając ich agregacji. Naprężenia ścinające indukują zmiany konformacyjne monomerów $A\beta$, co ułatwia ich agregację i inicjuje proces tworzenia fibryli. Co więcej, lokalna zmienność tych naprężeń - wynikająca zarówno z fizjologicznych różnic w geometrii mikrokanałów, jak i zmian zachodzących wraz z wiekiem - może prowadzić do formowania strukturalnie odmiennych agregatów amyloidowych [199]. Inne badania również wykazały, że zmiana prędkości przepływu w mikrokanałach prowadzi do zmiany struktury agregatów $A\beta$, przekształcając je od kulistych agregatów do bardziej rozwiniętych struktur włóknistych [200].

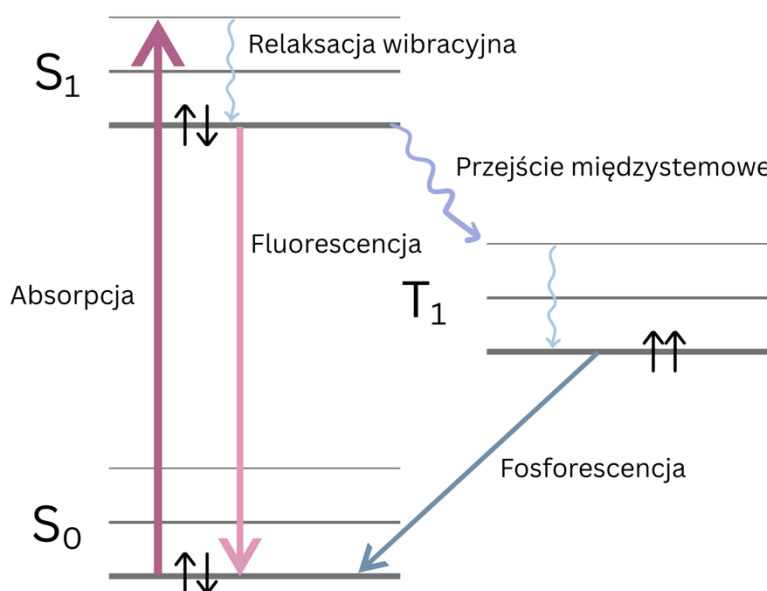
Podobne efekty obserwowane są również w przypadku innych białek, takich jak β -laktoglobulina, gdzie kontrolowany przepływ sprzyja tworzeniu mniej wytrzymałych, paciorkowatych fibryli w porównaniu do struktur powstających podczas intensywnego mieszania [201]. W przypadku apolipoproteiny C-II, naprężenia ścinające przyspieszały proces fibrylizacji, prowadząc do zmian strukturalnych oraz formowania oligomerów, które stanowią prekursorzy fibryli [202]. Dodatkowo, badania nad agregacją amyloidu białka lizozymu jaja kurzego (HEWL) uwiadcniają istotny wpływ przepływu na proces agregacji. Wykazano, że przepływ w mikrofluidycznym układzie przyspiesza proces agregacji białek amyloidowych, a odpowiednia kontrola tego procesu może być kluczowa dla opracowywania nowych terapii [203]. Badania nad agregacją $A\beta_{1-42}$ wykazały, że przepływ w systemach mikrofluidycznych znacząco przyspiesza proces agregacji tego peptydu. Testy z wykorzystaniem surfaktantów typu gemini wykazały, że związki te mogą skutecznie hamować proces formowania włókien amyloidowych $A\beta_{1-42}$, oferując potencjalną strategię terapeutyczną [204].

Mikrofluidyka, w kontekście badania agregacji $A\beta$, stała się cennym narzędziem umożliwiającym analizę wpływu małocząsteczkowych inhibitorów, jonów metali oraz warunków przepływu na procesy agregacyjne tego peptydu. Jak wykazano, obecność jonów takich jak Fe^{3+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} istotnie modyfikuje przebieg agregacji [205], a możliwość precyzyjnego sterowania przepływem w mikrokanałach pozwala nie tylko na odwzorowanie fizjologicznych warunków mikrośrodowiska, lecz także na badanie dynamicznych interakcji tych jonów z formującymi się strukturami agregatów. Zmiana morfologii i właściwości fizykochemicznych agregatów pod wpływem przepływu odgrywa istotną rolę w zrozumieniu mechanizmów tworzenia i różnicowania się struktur amyloidowych [206].

4 Metody badawcze

4.1 Detekcja procesu amyloidogenezy metodą fluorescencji tioflawiny T (ThT)

Tioflawina T (ang. thioflavin T, ThT) to kationowy barwnik z grupy benzotiazoli, szeroko wykorzystywany w badaniach nad agregacją białek amyloidogennych, ze względu na zdolność selektywnego wiązania się cząsteczek ThT z uporządkowanymi strukturami β -arkuszy, charakterystycznymi dla fibryli amyloidowych [207]. Po związaniu ze strukturami amyloidowymi ThT wykazuje istotne zmiany w widmie fluorescencji - pojawia się nowe maksimum wzbudzenia w okolicy 450 nm oraz znaczący wzrost intensywności emisji przy 482 nm. Zjawisko to nie występuje w obecności monomerów białkowych ani nieuporządkowanych agregatów. Mechanizm wzrostu fluorescencji ThT związany jest z ograniczeniem swobodnego ruchu cząsteczki barwnika po jej związaniu z fibrylami, co stabilizuje stan wzbudzony i umożliwia efektywną emisję fluorescencji [208].



Rysunek 9. Diagram Jabłońskiego.

Zjawiska te, związane z przejściami energetycznymi cząsteczki ThT, można przedstawić za pomocą diagramu Jabłońskiego (rysunek 9). Diagram Jabłońskiego przedstawia stany energetyczne cząsteczki oraz przejścia między nimi, które zachodzą w procesach fluorescencji i fosfofluorescencji. W diagramie tym wyróżnia się stan podstawowy (S_0), stany wzbudzone singletowe (S_1 , S_2) oraz tripletowe (T_1). Każdy z tych stanów może występować w różnych poziomach wibracyjnych. Po absorpcji fotonu cząsteczka wzbudza się do wyższego stanu wibracyjnego, który zazwyczaj szybko przechodzi do najniższego poziomu wibracyjnego stanu singletowego (S_1). Fluorescencja zachodzi, gdy cząsteczka powraca z wyższego stanu wzbudzonego (S_1) do stanu podstawowego (S_0), emitując foton. Emisja fotonu jest przesunięta w stronę dłuższych fal (przesunięcie Stokesa), co wynika z częściowej utraty energii na drodze między stanami

energetycznymi. Cząsteczki w stanie S_1 mogą również przejść do stanu tripletowego (T_1). Proces ten prowadzi do emisji fosforescencji [209].

Fluorescencja zachodzi znacznie szybciej niż fosforescencja. Po ustaniu działania źródła promieniowania wzbudzającego emisja fluorescencji zanika niemal natychmiast, ponieważ nie dochodzi do zmiany stanu spinowego. Fosforescencja trwa znacznie dłużej, a kierunek spinu elektronu może się zmienić, gdy elektron przechodzi do stanu o niższej energii. Emitowane fotony w procesie fluorescencji mają mniejszą energię niż fotony promieniowania wzbudzającego, dlatego widmo fluorescencji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych w porównaniu do widma absorpcji. Z kolei widmo fosforescencji jest przesunięte w kierunku fal dłuższych nie tylko względem widma absorpcji, ale także względem widma fluorescencji.

4.2 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

W 1986 roku Gerd Binnig i Heinrich Rohrer zostali uhonorowani Nagrodą Nobla w dziedzinie fizyki za opracowanie mikroskopu tunelowego (STM), umożliwiającego obrazowanie pojedynczych atomów na powierzchni materiałów. Sukces tej technologii zapoczątkował dynamiczny rozwój mikroskopów sond skanujących (SPM), wśród których szczególnie istotne miejsce zajęła mikroskopia sił atomowych (ang. atomic force microscopy, AFM).

Technika AFM pozwala na uzyskiwanie obrazów powierzchni z rozdzielczością atomową, wykorzystując oddziaływania zachodzące pomiędzy cienkim ostrzem (ang. tip) a badaną powierzchnią. Kluczowym elementem układu pomiarowego jest cienkie ostrze zamocowane na sprężystej dźwigni (ang. cantilever), której ugięcie pod wpływem sił oddziaływania jest rejestrowane przez system detekcji. Najczęściej stosowaną metodą jest detekcja optyczna, polegająca na odbiciu wiązki lasera od powierzchni dźwigni i rejestracji położenia odbitego promienia na fotodetektorze. Charakter oddziaływań pomiędzy sondą a próbką dobrze opisuje wykres potencjału Lennarda-Jonesa, przedstawiający zależność energii oddziaływania od odległości pomiędzy atomami ostrza i powierzchni próbki [210].

Mikroskop sił atomowych może pracować w różnych trybach obrazowania, w zależności od rodzaju badanej próbki oraz charakterystyki oddziaływań. W trybie kontaktowym (ang. contact mode) cienkie ostrze pozostaje w bezpośrednim kontakcie z powierzchnią próbki, przy bardzo małej, kontrolowanej sile docisku. W trybie bezkontaktowym (ang. non-contact mode) dźwignia oscyluje w niewielkiej odległości od powierzchni, a rejestrowane są zmiany częstotliwości drgań wynikające z przyciągających sił van der Waalsa lub oddziaływań elektrostatycznych. Natomiast w trybie przerywanego kontaktu (ang. tapping mode) dźwignia drga w pobliżu swojej częstotliwości rezonansowej, a cienkie ostrze okresowo styka się z powierzchnią próbki, co minimalizuje ryzyko uszkodzeń badanych materiałów.

Technika AFM znajduje zastosowanie nie tylko w obrazowaniu powierzchni krystalicznych, ale również w badaniu struktur biologicznych, takich jak DNA czy białka. Dzięki wysokiej rozdzielczości, mikroskopia sił atomowych wykorzystywana jest obecnie szeroko w badaniach materiałowych, biologicznych, chemii powierzchni oraz

nanotechnologii [211]. Okazała się również niezwykle przydatnym narzędziem w wizualizacji struktur amyloidowych.

4.3 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. transmission electron microscopy, TEM) to zaawansowana technika obrazowania, umożliwiająca badanie struktury materiałów w skali atomowej. Dzięki niej możliwe jest uzyskiwanie obrazów o rozdzielczości sięgającej nawet ułamków nanometrów, co pozwala na precyzyjne odwzorowanie budowy materiałów, których szczegóły są niewidoczne w tradycyjnej mikroskopii świetlnej. Podstawą działania TEM jest rejestrowanie i obrazowanie elektronów przechodzących przez odpowiednio przygotowaną, bardzo cienką próbkę. Grubość takiego preparatu zwykle nie przekracza 100 nm, co zapewnia odpowiednią transmisję elektronów i minimalizuje ich rozpraszanie. Kluczowym elementem mikroskopu jest kolumna próżniowa, w której zainstalowane są główne komponenty układu optyki elektronowej, takie jak źródło elektronów, system soczewek elektromagnetycznych oraz detektory powierzchniowe. Elektrony generowane są w dziale elektronowym w wyniku zjawiska termoemisji lub emisji polowej. Najczęściej stosowanym emiterem jest włókno wolframowe lub kryształ heksaboru lantanu (LaB_6). Elektrony przyspieszane są napięciem rzędu zwykle od 60 kV do 300 kV, co pozwala uzyskać odpowiednią długość fali i przenikliwość wiązki, niezbędną do obrazowania struktur w nanoskali. Wygenerowana wiązka elektronów jest następnie kształtowana i ogniskowana za pomocą systemu apertur oraz soczewek elektromagnetycznych. Utrzymanie wysokiej próżni w kolumnie mikroskopu jest warunkiem koniecznym - obecność cząsteczek gazu mogłaby powodować rozpraszanie elektronów, pogarszając jakość obrazu i ograniczając osiąganą rozdzielczość. Podczas badania wiązka elektronów przechodzi przez próbkę, ulegając rozpraszaniu i dyfrakcji na elementach jej wewnętrznej struktury. Elektrony nieodchylone tworzą obraz transmitowany, a układ soczewek obiektywu oraz soczewek pośrednich i projekcyjnych powiększa go, aż do uzyskania widocznego obrazu na ekranie. TEM umożliwia analizę struktury materiałów biologicznych (np. DNA, białek) jak również nanostruktur, takich jak nanocząstki czy cienkowarstwowe materiały [212]. Aby opisać zależność pomiędzy napięciem przyspieszającym a długością fali elektronu - kluczową dla zrozumienia rozdzielczości TEM - wykorzystuje się relatywistyczną postać równania de Broglie'a:

$$\lambda = \frac{h}{\sqrt{2m_0eU(1 + \frac{eU}{2m_0c^2})}}$$

gdzie:

- λ — długość fali elektronu,
- U — napięcie przyspieszające,
- h — stała Plancka,

m_0 — masą spoczynkową elektronu,
 c — prędkością światła.

Zależność ta pokazuje, że zwiększenie napięcia przyspieszającego prowadzi do skrócenia długości fali, a tym samym do zwiększenia teoretycznej rozdzielczości mikroskopu.

4.4 Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Spektroskopia dichroizmu kołowego (ang. circular dichroism, CD) to technika wykorzystywana do charakteryzowania struktury biopolimerów, takich jak białka i kwasy nukleinowe. Fizyczną podstawą tej techniki jest zróżnicowana absorpcja światła spolaryzowanego kołowo lewoskrętnie oraz prawoskrętnie przez cząsteczki optycznie czynne, czyli zawierające centrum chiralne. Dlatego struktura drugorzędowa białek może być analizowana na podstawie sygnałów CD w zakresie dalekiego ultrafioletu (UV) w przedziale długości fal od około 240 do 190 nm, które wynikają z przejść elektronowych w chromoforach amidowych wiązań peptydowych. W tym zakresie długości fal występują dwa typy przejść elektronowych odpowiedzialnych za sygnały CD: przejście $n \rightarrow \pi^*$ w około 222 nm oraz przejścia $\pi \rightarrow \pi^*$ (zarówno w orientacji równoległej, jak i prostopadłej) w okolicach 208 i 190 nm. Dodatkowo, jakościowe informacje o strukturze trzeciorzędowej mogą zostać uzyskane z widm CD zależnych od środowiska dla aromatycznych reszt białek w zakresie bliskiego UV (250 nm do 300 nm) [213].

Dla białek, wyniki często prezentowane są w postaci średniej molowej eliptyczności reszty, oznaczanej jako $[\theta]$:

$$[\theta] = \frac{\theta \times 100 \times M}{C \times l \times n}$$

gdzie:

θ — eliptyczność [mdeg],

M — masa cząsteczkowa białka [g/mol],

C — stężenie białka [mg/ml],

l — długość drogi optycznej [cm],

n — to liczba reszt aminokwasowych w białku.

Średnia molowa eliptyczność reszty, $[\theta]$, wyrażana jest w jednostkach $\text{deg} \cdot \text{cm}^2 \cdot \text{dmol}^{-1}$, co umożliwia porównanie wyników uzyskanych z różnych próbek, laboratoriów oraz używanych spektrometrów.

4.5 Spektroskopia UV-Vis

Spektroskopia absorpcyjna UV-Vis (ang. Ultraviolet–Visible spectroscopy) to technika analizy widmowej, w której bada się absorpcję promieniowania elektromagnetycznego z zakresu nadfioletu oraz światła widzialnego przez badane substancje. Proces ten polega na wzbudzeniu elektronów w badanym układzie do

wyższych poziomów energetycznych, co prowadzi do powstania charakterystycznych widm absorpcyjnych. W cząsteczkach, oprócz przejść elektronowych, mogą jednocześnie zachodzić wzbudzenia poziomów oscylacyjnych i rotacyjnych. Całkowita energia cząsteczki jest sumą energii elektronowej, oscylacyjnej i rotacyjnej, których wartości różnią się o kilka rzędów wielkości ($\Delta E_e > \Delta E_v \gg \Delta E_r$). Położenie pasma absorpcyjnego zależy głównie od zmiany energii elektronowej. Wzbudzenia elektronowe w obszarze UV-Vis dotyczą przede wszystkim elektronów wiązań π oraz elektronów niewiążących (n), które pod wpływem absorpcji promieniowania przechodzą na wyższe poziomy energetyczne [214]. Warunkiem zajścia takiego przejścia jest dostarczenie kwantu energii równego różnicy pomiędzy poziomami elektronowymi, zgodnie z zależnością:

$$\Delta E = h\nu$$

gdzie:

ΔE — różnica energii,

h — stała Plancka,

ν — częstotliwość promieniowania.

Fragment cząsteczki, który odpowiada za absorpcję promieniowania elektromagnetycznego w zakresie UV-Vis, określa się mianem chromoforu, którym mogą być przykładowo wiązania wielokrotne lub układy aromatyczne. To właśnie w obrębie chromoforu zachodzą przejścia elektronowe, które znajdują odzwierciedlenie w postaci pasm na rejestrowanym widmie absorpcyjnym.

Widmo UV-Vis najczęściej przedstawia się jako wykres zależności absorbancji (A) od długości fali (λ). Absorbancja stanowi logarytm dziesiętny stosunku natężenia promieniowania padającego na próbkę (I_0) do natężenia promieniowania, które przez nią przeniknęło (I), co opisuje zależność:

$$A = \log \frac{I_0}{I}$$

Zgodnie z prawem Lamberta-Beera, absorbancja (A) jest również proporcjonalna do stężenia badanej substancji (C) oraz do długości drogi optycznej (l), jak pokazuje poniższy wzór:

$$A = \epsilon Cl$$

gdzie:

A — absorbancja,

ϵ — molowy współczynnik ekstynkcji,

C — stężenie substancji w roztworze,

l — długość drogi optycznej.

4.6 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Dynamiczne Rozpraszanie Światła (ang. dynamic light scattering, DLS) to technika wykorzystywana do analizy rozmiarów cząsteczek w koloidalnych zawiesinach, oparta na zjawisku rozpraszania światła przez cząsteczki poruszające się w wyniku ruchów Browna [215]. W metodzie tej próbka jest oświetlana wiązką lasera, a fluktuacje intensywności rozproszonego światła, wynikające z nieuporządkowanego, losowego ruchu cząsteczek, są rejestrowane przez detektor. Fluktuacje intensywności światła są analizowane przez autokorelator, który oblicza funkcję opisującą czasowe zmiany sygnału. Zanik tej funkcji następuje wykładniczo, a czas zaniku zależy od szybkości ruchu cząsteczek w zawieszynie. Szybkość tego ruchu, będącego wynikiem przypadkowego oddziaływania cząsteczek z cząstkami medium, pozwala na obliczenie współczynnika dyfuzji translacyjnej badanych cząstek:

$$D_H = \frac{k_B T}{3\pi\eta D}$$

gdzie:

D_H — współczynnik dyfuzji,

T — temperatura,

k_B — stała Boltzmanna,

η — lepkość,

D — średnica hydrodynamiczna odpowiadająca średnicy cząsteczki w kształcie kuli.

Technika DLS umożliwia badanie próbek w szerokim zakresie stężeń oraz przy użyciu różnych rozpuszczalników. Kąt rozproszenia światła zależy od ustawienia detektora, przy czym najczęściej stosowane to 90° i 175° . Zarejestrowane fluktuacje intensywności światła rozproszonego są przetwarzane przez system analityczny aparatu, który na tej podstawie wyznacza hydrodynamiczną średnicę oraz odpowiadający jej rozkład wielkości cząstek. Wyniki prezentowane są w formie wykresu zależności intensywności rozproszenia od średnicy cząstek.

4.7 Spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

Spektroskopia w podczerwieni z transformatą Fouriera (ang. Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR) umożliwia rejestrację widm absorpcyjnych związków chemicznych w zakresie podczerwieni. W typowym spektrometrze FTIR źródłem promieniowania jest rozgrzane ciało doskonale czarne (najczęściej pręt z węgla krzemu - tzw. globar), emitujące promieniowanie w zakresie średniej podczerwieni. Wiązka IR kierowana jest następnie do interferometru Michelsona, którego zadaniem jest modulacja promieniowania. W interferometrze promieniowanie rozdzielane jest na dwie wiązki, odbijane od lusterek o różnej drodze optycznej, a następnie ponownie łączone. Interferometr

generuje interferogram, czyli sygnał o zmiennej intensywności w funkcji różnicy dróg optycznych – stanowiący zakodowaną informację o widmie źródła. Zmodyfikowana w interferometrze wiązka przechodzi następnie przez komorę z próbką, gdzie charakterystyczne dla niej częstotliwości drgań ulegają selektywnej absorpcji. Detektor rejestruje interferogram zmodyfikowany przez próbkę, obejmujący jednocześnie cały analizowany zakres częstotliwości. Równolegle wykonywany jest pomiar tła (bez próbki), co umożliwi późniejsze obliczenie widma absorpcji. Ostateczne widmo IR uzyskuje się poprzez zastosowanie transformaty Fouriera do interferogramu, co przekształca go do postaci klasycznego widma intensywność–liczba falowa. Typowy zakres pracy spektrometrów FTIR obejmuje średnią podczerwień od 4000 do 666 cm^{-1} (2,5–15 μm) [216].

Spektroskopia FTIR znajduje szerokie zastosowanie nie tylko w badaniach chemicznych, ale również w analizach strukturalnych związków biologicznych, takich jak peptydy i białka. Technika ta pozwala na uzyskanie informacji dotyczących organizacji strukturalnej cząsteczek, a szczególnie wartość wykazuje w analizie ich struktury drugorzędowej. W tego typu badaniach kluczową rolę odgrywa pasmo amidowe I, zlokalizowane w zakresie od 1700 do 1600 cm^{-1} , które powstaje głównie w wyniku drgań rozciągających wiązań C=O w grupach amidowych [217]. Pasma to odpowiada za dominującą część absorpcji w analizowanym zakresie widma i dostarcza informacji na temat udziału poszczególnych elementów strukturalnych białek, takich jak helisy α czy struktury β .

Do badań białek adsorbowanych na powierzchniach stałych szczególnie przydatnym rozwiązaniem jest wykorzystanie techniki osłabionego całkowitego wewnętrznego odbicia (ang. attenuated total reflection, ATR). W tej metodzie stosuje się kryształy wykonane z materiałów przezroczystych dla promieniowania IR, np. z germanu, siarczku cynku lub diamentowe. Specjalnie skonfigurowany układ optyczny kieruje wiązkę promieniowania na powierzchnię kryształu ATR. Gdy kąt padania promieniowania na granicę między gęstym medium (kryształem) a rzadszym środowiskiem (powietrzem, wodą lub roztworem buforowym, z białkiem lub bez) przekroczy wartość kąta granicznego, następuje zjawisko całkowitego wewnętrznego odbicia. W wyniku tego odbicia przy granicy faz powstaje tzw. fala penetrująca (fala zanikająca), która wnika na niewielką głębokość w warstwę próbki znajdującą się przy powierzchni kryształu i ulega częściowej absorpcji przez obecne w niej cząsteczki. Dzięki temu możliwa jest rejestracja widma IR bez konieczności specjalistycznego przygotowania próbki, np. w formie pastylek czy cienkich warstw [218].

Połączona mikroskopia AFM ze spektroskopią IR (NanoIR)

NanoIR to technika, która łącząc wysokorozdzielczy mikroskop sił atomowych z regulowanym laserem emitującym promieniowanie podczerwone, oferuje zaawansowane możliwości w zakresie pomiarów nanoskalowej absorpcji IR. Układ ten pozwala na wykonywanie pomiarów absorpcji promieniowania IR w funkcji liczby falowej na

poziomie nanoskali, co umożliwia charakteryzację badanych próbek z rozdzielczością przestrzenną niedostępną dla tradycyjnych technik spektroskopowych w podczerwieni. Kluczowe znaczenie w tej metodzie odgrywa zjawisko fototermicznej rezonansowej detekcji, znane również jako AFM-IR. W wyniku lokalnej absorpcji promieniowania IR przez badaną próbkę dochodzi do mikroskalowych rozszerzeń cieplnych, które są rejestrowane przez czuły detektor mikroskopu sił atomowych w postaci zmian sygnału rezonansowego. Dzięki temu możliwe jest uzyskiwanie informacji widmowych z obszarów o wymiarach rzędu kilkudziesięciu nanometrów [219].

4.8 Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)

SAXS, czyli małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (ang. small angle X-ray scattering) jest techniką umożliwiającą badanie struktury białek zarówno o uporządkowanej, jak i nieuporządkowanej strukturze w roztworze. Metoda ta pozwala na określenie kształtu i wymiarów makrocząsteczek oraz ich kompleksów w szerokim zakresie mas cząsteczkowych - od kilku kDa do nawet GDa. Unikalne możliwości oferują pomiary SAXS realizowane przy użyciu intensywnych źródeł synchrotronowych, dzięki którym możliwe jest szybkie zbieranie danych oraz prowadzenie pomiarów czasowo-rozdzielczych, dostarczających informacji na temat dynamiki procesów oraz oddziaływań pomiędzy cząsteczkami.

Schemat pomiaru w technice SAXS jest stosunkowo nieskomplikowany. Na badaną próbkę, zawierającą cząsteczki białka rozproszone w roztworze, kierowana jest skolimowana, monochromatyczna wiązka promieniowania rentgenowskiego. Promieniowanie rozproszone przez próbkę rejestrowane jest przy użyciu detektora promieniowania rentgenowskiego. Dla uzyskania wiarygodnych wyników niezbędne jest również zarejestrowanie wzoru rozpraszania ośrodka, w którym rozpuszczone zostało białko (buforu), który następnie odejmuje się od widma próbki. W ten sposób uzyskuje się sygnał pochodzący wyłącznie od badanych cząsteczek. Ostateczny wzór rozpraszania dostarcza informacji na temat ogólnego kształtu, rozmiarów oraz organizacji cząsteczek w roztworze.

W przypadku pomiarów SAXS prowadzonych na źródłach synchrotronowych, intensywna wiązka promieniowania rentgenowskiego może jednak prowadzić do uszkodzenia próbki na skutek procesów radiolizy próbki. Aby temu przeciwdziałać, najczęściej stosuje się serię krótkich ekspozycji tej samej próbki, a następnie porównuje uzyskane wzory rozpraszania, co pozwala szybko wykryć ewentualne zmiany wynikające z uszkodzenia materiału. Dodatkowo, w celu ograniczenia wpływu promieniowania na próbkę, stosuje się różne rozwiązania, takie jak przepływ próbki w komorze ekspozycyjnej w trakcie pomiaru czy zmniejszenie intensywności wiązki promieniowania z pomocą osłabiaczy [220].

Dane z pomiarów SAXS prezentowane są zazwyczaj jako zależność intensywności rozpraszania (I) od wektora rozpraszania q , definiowanego jako:

$$q = \frac{4\pi \sin\theta}{\lambda}$$

gdzie:

λ — długość fali promieniowania rentgenowskiego,

θ — połowa kąta pomiędzy padającą i rozpraszaną wiązką promieniowania.

Ponieważ długość fali promieniowania jest stała, a kąty rozpraszania w SAXS są zazwyczaj małe (zwykle poniżej 3°), wykres intensywności rozpraszania w zależności od q w praktyce pokazuje intensywność rozpraszania w funkcji kąta.

Wysokiej jakości profil rozpraszania w technice SAXS pozwala na wyznaczenie dwóch kluczowych parametrów dotyczących wielkości i kształtu cząsteczek: intensywności rozpraszania w kierunku zerowego kąta ($I(0)$) oraz promienia żyracji (R_g). $I(0)$ to intensywność promieniowania rozproszonego pod kątem zerowym ($\theta = 0^\circ$), której wartość nie może być zmierzona bezpośrednio, ale można ją wyznaczyć przez ekstrapolację. $I(0)$ jest związane z liczbą cząsteczek na jednostkę objętości (N) oraz objętością cząsteczki (V) podniesioną do kwadratu.

Promień żyracji (R_g) określa średnią odległość elementarnych objętości rozpraszających od ich środka masy, ważoną przez gęstość rozpraszania. Wartość R_g zależy od kształtu cząsteczki, a różne kształty rozpraszających cząstek o tej samej objętości mają różne wartości R_g . W praktyce, jedno z najprostszych narzędzi do oszacowania R_g i $I(0)$ stanowi przybliżenie Guiniera. Zgodnie z tą metodą, dla małych wartości q , zależność intensywności rozpraszania $I(q)$ od q^2 jest wykładnicza i można ją przedstawić jako:

$$I(q) = I(0)e^{\frac{-q^2 R_g^2}{3}}$$

gdzie:

$I(q)$ — intensywność rozpraszania przy wektorze rozpraszania q ,

$I(0)$ — intensywność rozpraszania w kierunku zerowego kąta ($\theta = 0^\circ$),

q — wektor rozpraszania,

R_g — promień żyracji.

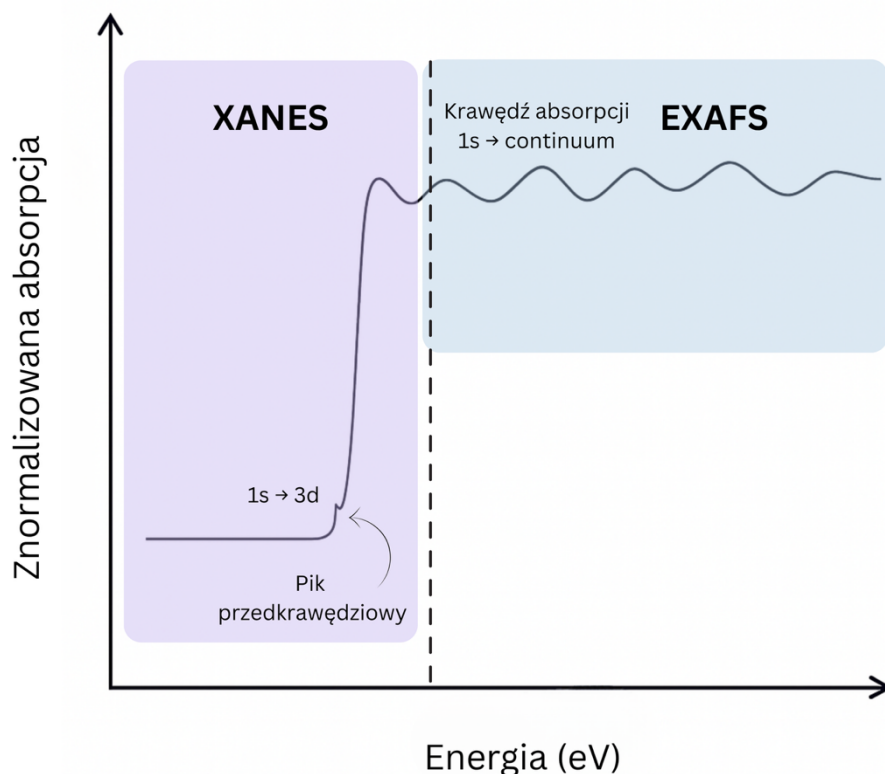
Stosując liniowe dopasowanie $\ln[I(q)]$ w funkcji q^2 , można wyznaczyć R_g i $I(0)$ na podstawie nachylenia i punktu przecięcia wykresu. Ta metoda sprawdza się najlepiej dla białek globularnych, dla których relacja ta jest prawdziwa, gdy $qR_g < 1,3$ [221].

4.9 Absorpcja promieniowania rentgenowskiego (XAS)

W technice rentgenowskiej spektroskopii absorpcyjnej (ang. X-ray absorption spectroscopy, XAS) dochodzi do absorpcji energii promieniowania rentgenowskiego w próbce, co prowadzi do wybicia elektronu z poziomu powłoki wewnętrznej na wyższy, niezapełniony poziom energetyczny. Z tego względu mówi się, że metoda ta umożliwia badanie niezajętych poziomów elektronowych w materiale. Choć termin XAS odnosi się ogólnie do zjawiska absorpcji promieniowania rentgenowskiego, w praktyce analizie poddaje się strukturę subtelną w widmach absorpcyjnych (ang. X-ray absorption fine structure, XAFS). W typowym eksperymencie XAFS próbka naświetlana jest wiązką promieniowania monochromatycznego, a energia promieniowania jest precyzyjnie dostrajana w zakresie krawędzi absorpcyjnej badanego pierwiastka. Po przekroczeniu energii jonizacji atomu dochodzi do wybicia elektronu z powłoki wewnętrznej i emisji fotoelektronu o określonej energii kinetycznej, który można traktować jako falę materii (falę de Broglie'a). W ciele stałym lub w materiałach skondensowanych fotoelektron nie opuszcza układu swobodnie - jego fala ulega koherentnemu rozpraszaniu na atomach znajdujących się w otoczeniu atomu centralnego, zwykle w kilku najbliższych sferach koordynacyjnych. Fale rozproszone nakładają się z falą pierwotną fotoelektronu, prowadząc do interferencji o charakterze konstruktywnym lub destruktywnym, zależnie od geometrii lokalnego otoczenia. Efektem tej interferencji jest okresowa modulacja efektywnego przekroju czynnego absorpcji promieniowania rentgenowskiego, obserwowana w widmach XAFS jako charakterystyczne oscylacje w obszarze EXAFS. Analiza tych oscylacji umożliwia określenie lokalnego uporządkowania strukturalnego wokół badanego atomu, w tym odległości międzycząsteczkowych, liczby koordynacyjnej oraz stopnia nieuporządkowania [222].

Widma XAFS (rysunek 10) dzieli się zazwyczaj na dwa zakresy: XANES (ang. X-ray absorption near edge structure), obejmujący obszar od około 50 eV poniżej do 100 eV powyżej głównej krawędzi absorpcyjnej, oraz EXAFS (ang. extended X-ray absorption fine structure), które zaczyna się powyżej zakresu XANES i rozciąga się na setki eV powyżej krawędzi.

Widma XANES można dodatkowo podzielić na region przedkrawędziowy oraz główną krawędź absorpcyjną. W przypadku metali przejściowych, sygnał pre-krawędzi odpowiada wzbudzeniu elektronu z poziomu 1s (powłoka K) na poziom 3d. Choć w najprostszej wersji jest to przejście lokalne o charakterze kwadrupolowym ($1s \rightarrow 3d$), w rzeczywistości może ono ulegać modyfikacjom na skutek mieszania orbitali metal–ligand zarówno lokalnie, jak i nielokalnie. Dzięki temu region pre-krawędzi stanowi czuły wskaźnik zmian w elektronowej strukturze badanego układu.



Rysunek 10. Przykładowe widmo absorpcji promieniowania rentgenowskiego (XAFS), podzielone na zakres XANES (struktura blisko krawędzi) i EXAFS (rozszerzona struktura drobna). Widoczny jest pik przedkrawędziowy (przejście $1s \rightarrow 3d$) oraz główna krawędź absorpcyjna (przejście $1s \rightarrow \text{continuum}$).

Chociaż XANES i EXAFS rejestrowane są w ramach tego samego pomiaru, dostarczają różnych, komplementarnych informacji. Analiza XANES pozwala ocenić specjację (stopień utlenienia) oraz geometrię najbliższego otoczenia badanego atomu, natomiast EXAFS umożliwia precyzyjne określenie parametrów strukturalnych, takich jak długości wiązań, liczba koordynacyjna i stopień nieuporządkowania atomów w najbliższym otoczeniu.

4.10 Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Dyfrakcja rentgenowska (ang. X-ray diffraction, XRD) jest jednym z podstawowych narzędzi do badania struktur krystalicznych. Technika ta opiera się na dyfrakcji promieni rentgenowskich na sieci krystalicznej. W warunkach laboratoryjnych promieniowanie rentgenowskie jest generowane w lampie rentgenowskiej, w której elektron jest przyspieszany i kierowany na materiał anody (najczęściej: Cu, Mo, Ag). W wyniku tego procesu powstaje charakterystyczne promieniowanie, które następnie jest filtrowane, kolimowane i kierowane na próbkę. Promieniowanie rentgenowskie oddziałujące z próbką ulega dyfrakcji na sieci krystalicznej. Zjawisko to zachodzi jedynie wtedy, gdy spełnione są warunki prawa Bragga:

$$n\lambda = 2d\sin\theta$$

gdzie:

n — rząd refleksu

λ — długość fali promieniowania rentgenowskiego,

d — odstęp między płaszczyznami w sieci krystalicznej,

θ — kąt Bragga.

Na podstawie tych pomiarów możliwe jest określenie wartości odstępów międzypłaszczyznowych d oraz identyfikacja próbki poprzez porównanie uzyskanych danych z referencyjnymi wzorcami.

4.11 Przepływ mikrofluidyczny

Mikrofluidyka to obszar badań, który koncentruje się na badaniu przepływu cieczy w mikroskali, zwykle w kanałach o wymiarach od mikrometrów do milimetrów. Współczesne urządzenia mikrofluidyczne często projektowane są w taki sposób, by precyzyjnie dozować i mieszać roztwory w mikroreaktorach lub naśladować warunki przepływów występujące w organizmach żywych, umożliwiając modelowanie zjawisk biologicznych [223,224].

W przepływach mikrofluidycznych, które ze względu na małe wymiary kanałów oraz niskie liczby Reynoldsa są z reguły laminarnie uporządkowane, szczególną rolę odgrywają siły ścinające [225,226]. Wynikają one z gradientów prędkości pomiędzy sąsiadującymi warstwami cieczy, co prowadzi do powstania naprężeń lepkościowych. W przypadku cieczy newtonowskich naprężenie ścinające (τ) jest proporcjonalne do gradientu prędkości ($\frac{\Delta v}{\Delta y}$) w kierunku prostopadłym do kierunku przepływu, zgodnie ze wzorem:

$$\tau = \mu \cdot \frac{\Delta v}{\Delta y}$$

gdzie:

μ — lepkość cieczy

W przypadku roztworów białek, zależność między naprężeniem ścinającym a gradientem prędkości może być bardziej skomplikowana, ponieważ niektóre roztwory wykazują cechy nienewtonowskich cieczy, gdzie lepkość zależy od sił ścinających oraz innych czynników, takich jak środowisko lub stężenie białka.

4.12 Analiza termicznej stabilności białek metodą termofluorymetryczną

Analiza termicznej stabilności białek (ang. protein thermal shift assay, PTSA) to technika wykorzystywana do oceny stabilności konformacyjnej białek w warunkach zmieniającej się temperatury. Metoda ta opiera się na pomiarze zmian fluorescencji

barwnika np. SYPRO orange, którego sygnał wzrasta w odpowiedzi na odsłanianie hydrofobowych fragmentów białka podczas jego denaturacji cieplnej.

W trakcie analizy roztwór białka miesza się z fluorescencyjnym barwnikiem, a następnie poddaje kontrolowanemu podgrzewaniu w systemie umożliwiającym jednoczesny pomiar fluorescencji (np. w systemach Real-Time PCR). W miarę wzrostu temperatury struktura białka ulega rozfałdowaniu, co prowadzi do odsłonięcia wewnętrznych, hydrofobowych regionów, z którymi wiąże się barwnik, powodując wzrost sygnału fluorescencyjnego.

Na podstawie rejestrowanych zmian fluorescencji w funkcji temperatury generowana jest krzywa denaturacji białka. Charakterystycznym parametrem tej krzywej jest temperatura topnienia (T_m), czyli temperatura, przy której połowa cząsteczek białka znajduje się w stanie natywnym, a połowa w stanie zdenaturowanym.

Dodatkowo, metoda ta umożliwia badanie wpływu ligandów, jonów, pH lub innych czynników na stabilność białek. Zmiana temperatury topnienia w obecności liganda (ΔT_m) jest miarą stabilizacji lub destabilizacji kompleksu białko–ligand. Pomiar wartości T_m w serii próbek zawierających różne stężenia liganda pozwala także na wyznaczenie stałej dysocjacji (K_D) dla badanego układu.

Technika ta znajduje szerokie zastosowanie w badaniach strukturalnych, projektowaniu leków, optymalizacji warunków buforowych oraz w analizie oddziaływań białko–ligand [227].

4.13 Testy przeżywalności komórek (WST-1)

Test WST-1 (chlorek 2-(4-jodofenylo)-3-(4-nitrofenylo)-5-(2,4-disulfofenylo)-2H-tetrazoliowy, sól monosodowa) należy do grupy barwnych testów kolorymetrycznych wykorzystywanych do oceny żywotności i proliferacji komórek hodowanych *in vitro*. Podstawą działania tej metody jest redukcja soli tetrazoliowej WST-1 przez dehydrogenazy mitochondrialne do rozpuszczalnego w wodzie barwnego formazanu. Ilość powstającego produktu jest wprost proporcjonalna do liczby żywych, metabolizujących komórek w próbce [228].

W odróżnieniu od klasycznego testu MTT, który wykorzystuje dodatnio naładowaną sól tetrazoliową zdolną do penetracji wnętrza komórki i ulegającą redukcji wewnątrzkomórkowej, WST-1 zawiera grupy sulfonowe nadające jej ładunek ujemny. W efekcie cząsteczka ta nie przenika przez błonę komórkową, a proces redukcji zachodzi na zewnątrz komórki - na powierzchni błony plazmatycznej, z udziałem enzymów błonowych oraz pośredników transportujących elektrony.

Powstający w tej reakcji formazan jest rozpuszczalny w wodzie, co umożliwia bezpośredni pomiar jego stężenia w pożywce hodowlanej przy użyciu spektrofotometru. Maksimum absorpcji produktu redukcji przypada w zakresie 420–480 nm, co pozwala na ilościową ocenę aktywności metabolicznej i tym samym liczby żywych komórek.

4.14 Oznaczanie reaktywnych form tlenu za pomocą sondy diacetat 2',7'-dichlorodihydrofluorescyny (DCFH-DA)

Jedną z najczęściej wykorzystywanych metod oznaczania reaktywnych form tlenu w komórkach ssaczy są techniki oparte na sondach fluorescencyjnych. Wśród nich szczególną popularnością cieszy się octan dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH-DA), ze względu na wysoką czułość, dobrą rozdzielczość oraz łatwość analizy otrzymywanych wyników. DCFH-DA jest związkiem niewykazującym fluorescencji, który swobodnie przenika przez błonę komórkową. Wewnątrz komórki ulega hydrolizie pod wpływem esteraz do dichlorodihydrofluoresceiny (DCFH), która następnie, w obecności ROS, utlenia się do cechującej się silną fluorescencją cząsteczki 2',7'-dichlorofluoresceiny (DCF). Rejestrowana intensywność fluorescencji jest proporcjonalna do ilości reaktywnych form tlenu w badanej próbce, co umożliwia ich ilościowe oznaczenie [229].

5 Część doświadczalna – materiały i metody

5.1 Nadprodukcja ludzkiej cystyny C

Nadprodukcja ludzkiej cystatyny C została przeprowadzona w szczepie *E. coli* SHuffle® T7 z zastosowaniem protokołu hodowli bakteryjnej [165]. Bakterie inkubowano w standardowej pożywce LB, zawierającej 10 g/l tryptonu, 5 g/l ekstraktu drożdżowego oraz 10 g/l NaCl, suplementowanej kanamycyną w stężeniu 50 µg/ml, w temperaturze 30°C przy ciągłym wytrząsaniu z prędkością 180 rpm.

Proces hodowli bakterii rozpoczęto od przygotowania prekultury w pożywce LB, rozdzielonej do dwóch kolb po 100 ml. Pożywkę sterylizowano przez godzinę w 120°C, a następnie studzono do około 30°C. Po ostudzeniu do każdej kolby dodano kanamycynę (100 µl roztworu o stężeniu 50 µg/µl na 100 ml) oraz 3 krople stężonej glicerolowej zawiesiny bakteryjnej (stoku). Kultury inkubowano przez noc w 30°C z wytrząsaniem orbitalnym (170 rpm), zapewniając odpowiednie natlenienie, które jest kluczowe dla efektywnej produkcji białka.

Na kolejny dzień przygotowano pożywkę właściwą w większej objętości - 4 litry medium LB (20 g tryptonu, 10 g ekstraktu drożdżowego i 20 g NaCl na 2 l), podzielonej do czterech kolb po 1 litrze każda. Do każdej kolby dodano 1 ml kanamycyny o stężeniu 50 µg/µl oraz 30 ml prekultury, po czym bakterie inkubowano w temperaturze 30°C przy wytrząsaniu (170 rpm). Wzrost kultury monitorowano mierząc optyczną gęstość (ang. optical density, OD) przy 600 nm. Po osiągnięciu wartości $OD_{600} = 1$, odpowiadającej fazie logarytmicznej wzrostu bakterii, dokonano indukcji ekspresji białka poprzez dodanie 400 µl 1M roztworu IPTG. Następnie inkubację kontynuowano przez 4 godziny w tych samych warunkach.

Po zakończeniu indukcji komórki zebrano przez wirowanie (15 minut, 3000 g, 4°C), usunięto supernatant, a osad zawieszono w 20 ml zimnej wody, po czym ponownie odwirowano i zamrożono do dalszych etapów ekstrakcji.

W kolejnym etapie, po rozmrożeniu na lodzie, próbki komórkowe zawieszono w 20 ml buforu A (20 mM Tris-HCl, pH 7.5) z dodatkiem inhibitora proteaz, 1 mM chlorowodoru benzamidyny (BZA). Zawiesinę homogenizowano mechanicznie, przepuszczając ją trzykrotnie przez strzykawkę z igłą, co poprawiło rozdrobnienie komórek. Następnie poddano próbki sonikacji ultradźwiękowej (55% amplitudy drgań sondy, 15 cykli po 30 sekund z 30-sekundowymi przerwami, w 4°C) przy użyciu urządzenia Vibra-Cell™ (Sonics, Newtown, Connecticut, USA), co doprowadziło do efektywnego rozbicia ścian komórkowych i uwolnienia białek.

Po sonikacji próbki odwirowano przez 40 minut przy 40 000 g i 4°C, aby usunąć nierozpuszczalne fragmenty komórek i organelle. Supernatant, zawierający rozpuszczalne białka, w tym nadprodukowaną cystatynę C, przefiltrowano przez filtr o porowatości 0,45 µm, eliminując pozostałości komórkowe.

5.2 Oczyszczanie ludzkiej cystatyny C

Supernatant zawierający rekombinowane białko HCC przefiltrowany przez filtr o średnicy porów 0,45 μm , został następnie poddany oczyszczaniu metodą szybkiej chromatografii cieczowej pod wysokim ciśnieniem (ang. fast protein liquid chromatography, FPLC) przy użyciu systemu ÄKTA Pure 25 FPLC (GE Healthcare, Barrington, Illinois, USA). System równoważono buforem A, zawierającym 20 mM Tris-HCl (pH 7,5) oraz 1 mM benzamidyny (BZA).

Próbkę załadowano na połączony układ dwóch kolumn wymiany jonowej anionowej HiTrap Q FF (2 \times 1 ml) (GE Healthcare, Barrington, Illinois, USA) oraz jednej kolumny kationowymiennej HiTrap SP FF (5 ml) (GE Healthcare, Barrington, Illinois, USA). Po załadowaniu materiału i przepłukaniu kolumn buforem A, kolumny anionowymienne zostały odłączone. Elucję białka z kolumny SP prowadzono przy zastosowaniu gradientu stężenia NaCl w zakresie 0–1 M w buforze B (20 mM Tris-HCl, pH 7,5, 1 M NaCl, 1 mM BZA). Proces monitorowano na podstawie absorbancji przy długości fali 280 nm, a obecność oczekiwanego białka w kolejnych frakcjach każdorazowo potwierdzano przy użyciu elektroforezy SDS-PAGE.

Fracje zawierające białko o masie cząsteczkowej około 14 kDa poddano dializie przez noc wobec 20 mM wodorowęglanu amonu (pH 8.0) w temperaturze 4°C. Następnie próbkę skoncentrowano do objętości około 2 ml z zastosowaniem systemu ultrafiltracji Amicon Ultra-15 z membraną o odcięciu 10 kDa.

Końcowy etap oczyszczania obejmował chromatografię żelową (ang. size exclusion chromatography, SEC) na kolumnie HiLoad® Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare, Barrington, Illinois, USA), równoważonej buforem zawierającym 50 mM wodorowęglanu amonu (pH 8.0). Elucję prowadzono w stałym przepływie, monitorując absorbancję przy 280 nm. Fracje zawierające monomeryczną postać HCC łączono, a następnie liofilizowano. Czystość uzyskanego preparatu weryfikowano metodą SDS-PAGE.

5.3 Analiza elektroforetyczna SDS-PAGE

Do próbek białkowych dodawano bufor ładujący zawierający dodecylsulfian sodu, β -merkaptoetanol, błękit bromofenolowy oraz glicerol, a następnie poddawano je denaturacji w 95°C przez 5 minut. Żele poliakrylamidowe przygotowywano w układzie dwóch warstw: żelu rozdzielającego (pH 8,8) i zagęszczającego (pH 6,8), zawierających akrylamid, bisakrylamid, nadsiarazan amonu oraz N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiaminę. Stosunek akrylamidu do bisakrylamidu determinował wielkość porów matrycy żelowej. Żel rozdzielający polimeryzowano między szklanymi płytkami, a na jego powierzchnię nakładano żel zagęszczający z formującym studzienki grzebieniem. Elektroforezę prowadzono w układzie buforowym Tris–glicyna–SDS (30 g Tris base, 144 g glicyny, 10 g SDS; pH 8,3), umożliwiając migrację denaturowanych białek w kierunku anody. Po zakończeniu procesu żel rozdzielający barwiono błękitem Coomassie, co pozwalało na wizualizację prążków białkowych oraz oszacowanie ich masy cząsteczkowej względem markera referencyjnego.

5.4 Synteza nanocząstek tlenku miedzi (II)

Nanocząstki tlenku miedzi (II) (CuO) zostały zsyntetyzowane na podstawie metody opisanej przez Ahamed i współpracowników [230] z drobnymi modyfikacjami. W tym celu jako prekursor użyto octanu miedzi (II) [Cu(CH₃COO)₂·H₂O] (98%), a wodorotlenek sodu (NaOH) pełnił funkcję środka redukującego. Roztwór 0,2 M octanu miedzi (450 ml) oraz 1,5 ml kwasu octowego (CH₃COOH) został podgrzany do wrzenia z mieszaniem magnetycznym w temperaturze około 240°C. Następnie do reakcji dodano 20 ml roztworu NaOH o stężeniu 6 M. Całość refluksowano przez 2,5 godziny, co skutkowało przemianą koloru roztworu z niebieskiego na głęboko czarny, świadcząca o powstaniu nanocząstek CuO.

Po schłodzeniu do temperatury pokojowej, osad CuO został wielokrotnie płukany etanolem absolutnym i wirowany (2 000 g, 10 minut oraz 8 000 g, 10 minut, powtórzone czterokrotnie) w celu oczyszczenia. Otrzymany produkt suszono pod ciśnieniem przez około 2 godziny, uzyskując suchy proszek nanocząstek CuO o masie 5,4 g.

Odczynniki chemiczne potrzebne do przeprowadzenia syntezy zostały zakupione w Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA).

5.5 Synteza nanocząstek miedzi

W celu zsyntetyzowania nanocząstek miedzi zastosowano metodykę opisaną przez Sulce i współpracowników [231]. Prekursorem w syntezie był chlorek miedzi (II), natomiast jako środek redukujący wykorzystano kwas askorbinowy. W pierwszym etapie 0,34 g chlorku miedzi (II) dwuwodnego rozpuszczono w 20 ml wody, uzyskując niebieski roztwór o stężeniu 0,2 M. Następnie dodano 1,76 g kwasu L-askorbinowego, co spowodowało odbarwienie roztworu oraz wytrącenie białego osadu.

Mieszanie umieszczono w kolbie wyposażonej w chłodnicę zwrotną, umożliwiającą podgrzewanie roztworu do 80°C przy jednoczesnym ograniczeniu jego parowania. Reakcję prowadzono przez 16 godzin, przy mieszaniu magnetycznym (300 rpm). W trakcie syntezy obserwowano stopniową zmianę barwy roztworu - od bezbarwnej, przez pomarańczową, aż do ciemnobrązowej zawiesiny, świadczącej o powstawaniu nanocząstek miedzi.

Po zakończeniu reakcji dyspersję nanocząstek schłodzono do temperatury pokojowej, a następnie oddzielono od białego osadu przez wirowanie (10 minut przy 4000 rpm). Otrzymaną dyspersję wymieszano z równą objętością cykloheksanonu, co spowodowało transfer nanocząstek z fazy wodnej do organicznej. W celu skuteczniejszego rozdzielenia faz zastosowano szklany rozdzielacz laboratoryjny. W kolejnych etapach nanocząstki przeniesiono ponownie do fazy wodnej, wykorzystując roztwór wodorotlenku sodu (NaOH). Tak przeprowadzona stabilizacja, oparta na obecności grup hydroksylowych, skutecznie zapobiegała utlenianiu nanocząstek do tlenku miedzi (II). Ostatecznie nanocząstki miedzi były gotowe do dalszej charakterystyki, jednak nie zostały włączone do kolejnych eksperymentów z białkiem ze względu na trudności w wiarygodnym

określeniu ich efektywnego stężenia w roztworze. Z tego powodu w niniejszej pracy skupiono się przede wszystkim na nanocząstkach CuO.

5.6 Spektroskopia UV-Vis

Do pomiarów absorpcyjnych w zakresie UV-Vis wykorzystano spektrofotometr V-650 (JASCO, Tokio, Japonia), wyposażony w dwa źródła promieniowania: lampę deuterową (190–350 nm) oraz lampę halogenową (330–900 nm). Monochromatyzację wiązki zapewniała siatka dyfrakcyjna o gęstości 1200 linii/mm. Widma rejestrowano w zakresie 400–800 nm z szybkością 100 nm/min, stosując jednorazowe kuwety plastikowe o długości drogi optycznej 1 cm.

5.7 Dynamiczne rozpraszanie światła (DLS)

Pomiary wielkości cząstek w roztworze przeprowadzono metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) z wykorzystaniem analizatora Litesizer™ 500 (Anton Paar, Graz, Austria), wyposażonego w laser półprzewodnikowy o długości fali 658 nm i mocy 40 mW. Pomiarów dokonywano w trybie rozpraszania wstecznego przy kącie 175° oraz w trybie bocznym przy kącie 90°, stosując jednorazowe kuwety spektrofotometryczne. Dane analizowano za pomocą oprogramowania Kalliope™ (Anton Paar, Graz, Austria), a na podstawie współczynników dyfuzji obliczano średnice hydrodynamiczne cząstek.

5.8 Dyfrakcja promieniowania rentgenowskiego (XRD)

Pomiary dyfrakcyjne materiałów proszkowych przeprowadzono za pomocą dyfraktometru rentgenowskiego HZG-4 (Carl Zeiss, Jena, Niemcy) pracującego w geometrii Bragg-Brentano, wyposażonego w lampę rentgenowską z anodą Cu i filtr niklowy, generującą promieniowanie rentgenowskie o długości fali wynoszącej 1,54178 Å. Lampa zasilana była z generatora rentgenowskiego TUR M62 (Seifert, Ahrensburg, Niemcy) pracującego przy natężeniu prądu 30 mA oraz napięciu 30 kV. Nanocząstki mechanicznie rozgniatano w moździerzu agatowym w celu ujednorodnienia proszku, a następnie umieszczano w uchwycie akrylowym. Dane XRD rejestrowane były metodą skaningową w temperaturze pokojowej, z krokiem 0,04° na sekundę w zakresie kątów 2θ od 25° do 90°.

5.9 Absorpcja promieniowania rentgenowskiego (XAS)

Badania metodą spektroskopii absorpcji promieniowania rentgenowskiego (XAS) przeprowadzono na linii pomiarowej P64 [232,233] w synchrotronie PETRA III w ośrodku badawczym DESY (Hamburg, Niemcy). Linia ta jest wyposażona w 2-metrowy, 58-polowy undulator o okresie 32,8 mm, emitujący promieniowanie synchrotronowe o wysokiej jasności spektralnej. Selekcję odpowiedniej długości fali realizowano za pomocą kriogenicznie chłodzonego monochromatora z podwójnym układem kryształów krzemu o orientacji (111) (ang. double-crystal monochromator, DCM), a dodatkowe elementy optyczne (układ lusterek rentgenowskich) umożliwiały skupienie wiązki na

próbce. Intensywność padającego i transmitowanego promieniowania synchrotronowego monitorowano za pomocą dwóch komór jonizacyjnych, natomiast sygnał fluorescencji rejestrowano detektorem półprzewodnikowym typu TFY PIPS (Canberra GmbH, Rüsselsheim, Niemcy). Próbkę przygotowano zarówno w formie pastylek w matrycy z celulozy, jak i w postaci ciekłej. Kontrolę temperatury podczas pomiarów zapewniał kriostat przepływowy chłodzony ciekłym azotem, umożliwiający stabilizację temperatury na poziomie 77 K. Dzięki zaawansowanej infrastrukturze i wysokiej jasności źródła możliwe było wykonanie eksperymentów w trybach XANES oraz EXAFS, umożliwiających badanie lokalnej struktury elektronowej oraz analizy koordynacyjnej pierwiastków obecnych w badanych próbkach.

5.10 Małokątowe rozpraszanie promieniowania rentgenowskiego (SAXS)

Pomiar małokątowego rozpraszania promieniowania rentgenowskiego (SAXS) wykonano w dwóch ośrodkach badawczych: na linii badawczej P12 (BioSAXS) [234] w synchrotronie PETRA III w ośrodku synchrotronowym DESY (Hamburg, Niemcy) oraz na linii BM29 (BioSAXS) [235] w ośrodku ESRF (Grenoble, Francja). Na linii P12 wykorzystano promieniowanie synchrotronowe generowane przez undulator U29 pracujący w zakresie energii 4–20 keV. Wiązka była ogniskowana za pomocą układu luster w geometrii Kirkpatricka–Baez oraz kolimowana systemem szczelin, uzyskując na próbce rozmiar wiązki około $120 \times 200 \mu\text{m}$ (wysokość \times szerokość). Pomiar prowadzono w temperaturze 4°C, a detekcję sygnału realizowano przy użyciu detektora Pilatus 2M (Dectris, Baden-Dättwil, Szwajcaria) w układzie próżniowym. Na linii BM29 zastosowano promieniowanie synchrotronowe generowane przez magnes uginający (ang. bending magnet) generujący promieniowanie synchrotronowe w zakresie energii 7–15 keV. Rozproszone na próbce promieniowanie rejestrowano detektorem Pilatus3 2M (Dectris, Baden-Dättwil, Szwajcaria) w układzie próżniowym. Pomiar prowadzono w temperaturze 4°C. W obu przypadkach próbki w postaci ciekłej umieszczono w probówkach PCR, z których były następnie automatycznie przenoszone do kowetki pomiarowej za pomocą robota dozującego. Dane analizowano przy użyciu programu PRIMUS (ATSAS package, EMBL Hamburg, Niemcy) [236]. Pomiar SAXS wykonano dla trzech typów próbek: ludzkiej cystatyny C, nanocząstek oraz HCC z nanocząstkami po przepływie przez układ mikrofluidyczny.

5.11 Transmisyjna mikroskopia elektronowa (TEM)

Obrazowanie morfologii próbek wykonano za pomocą transmisyjnego mikroskopu elektronowego (JEOL Ltd., Tokio, Japonia). Zawiesiny nanocząstek rozcieńczano w wodzie ultraczystej w zakresie 1:100–1:1000, w zależności od stężenia wyjściowego. Próbkę przed nanoszeniem poddawano krótkiej sonikacji w celu zdyspergowania aglomeratów. Około 5 μl rozcieńczonej zawiesiny nanoszono na miedziane siatki pokryte warstwą węgla o grubości 15–25 nm (Ted Pella, Inc., Redding, Kalifornia, USA; 300 oczek). Po naniesieniu siatki pozostawiano do wyschnięcia w temperaturze pokojowej przez co najmniej 24 h. Analizę rozkładu wielkości cząstek przeprowadzono na

podstawie co najmniej dziewięciu obrazów, wykorzystując oprogramowanie ImageJ (NIH, Bethesda, Maryland, USA) [237].

5.12 Spektroskopia w podczerwieni (FTIR)

Rejestrację widm w zakresie podczerwieni przeprowadzono przy użyciu spektrometru FTIR Tensor 27 (Bruker Optics, Ettlingen, Niemcy) wyposażonego w przystawkę ATR Platinum z jednoodbiciowym diamentowym kryształem. Na powierzchnię kryształu наносzono po 10 μl badanej próbki. Widma rejestrowano w zakresie widmowym 4000–400 cm^{-1} , z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Każdy pomiar stanowił transformatę Fouriera z 256 zarejestrowanych interferogramów. Zarejestrowane dane wygładzono metodą Savitzky'ego-Golaya. Do analizy danych wykorzystano oprogramowanie Opus 7.5 (Bruker Optics, Ettlingen, Niemcy) w celu przeprowadzenia korekty linii bazowej oraz program PeakFit v 4.12 (Systat Software, San Jose, Kalifornia, USA) do określenia położenia pasm absorpcyjnych.

5.13 Spektroskopia dichroizmu kołowego (CD)

Widma dichroizmu kołowego (CD) rejestrowano za pomocą spektropolarymetru J-815 (Jasco, Tokio, Japonia). Pomiarów prowadzono w zakresie długości fal 185–260 nm, przy prędkości skanowania 100 nm/min, rozdzielczości 1 nm oraz czasie integracji wynoszącym 2 s na punkt. Każde widmo stanowiło średnią z dziesięciu kolejnych przebiegów. Do pomiarów zastosowano kuwety kwarcowe o długości drogi optycznej 0,1 mm. Widmo buforu rejestrowano jako tło i odejmowano od sygnałów mierzonych próbek. Zarejestrowane dane wygładzono metodą Savitzky'ego-Golaya, a ich obróbkę i analizę przeprowadzano przy użyciu oprogramowania Spectra Manager II (Jasco, Tokio, Japonia).

5.14 Testy z użyciem fluorescencyjnego czytnika płytek

Pomiary spektrofluorymetryczne przeprowadzono z użyciem płytek 96-dołkowych o zmniejszonej powierzchni dna (ang. half area) oraz płytek 384-dołkowych typu low volume (Corning Inc., Corning, Nowy Jork, USA), obie z przezroczystym, płaskim dnem. Pomiarów dokonano za pomocą fluorescencyjnego czytnika płytek (FLUOstar Omega microplate reader, BMG LABTECH, Offenburg, Niemcy). Długości fal wzbudzenia i emisji wynosiły odpowiednio 448 i 482 nm. Roztwór roboczy tioflawiny T (ThT) o stężeniu 2 mM przygotowano w wodzie dejonizowanej (MQ), a następnie przepuszczono przez filtr strzykawkowy o porach 0,22 μm . Do testów z tioflawiną T próbki przygotowano w buforze MES 100 mM z 200 mM NaCl (pH 6), dodając 0,2 mM ThT oraz stałe stężenie HCC wynoszące 3 mg/ml. Próbki HCC zostały uprzednio poddane wirowaniu przez 30 minut w temperaturze 4°C przy około 20 000 g, aby usunąć agregaty. Bufor do oligomeryzacji nie jest konwencjonalnym buforem stosowanym w tego typu badaniach, jednak ze względu na stabilność nanocząstek wybrano go do przeprowadzenia tych pomiarów. W warunkach pH 6 próbki zawierały nanocząstki CuO w stężeniach 45, 90 i 135 $\mu\text{g/ml}$, natomiast w pH 4 zastosowano stężenia 225, 90, 22,5,

11,25 oraz 0,225 $\mu\text{g/ml}$. Wszystkie eksperymenty powtórzono trzykrotnie w stałej temperaturze 47°C przy ciągłym mieszaniu z prędkością 700 rpm. Całkowita objętość mieszaniny reakcyjnej dla każdego dołka wynosiła 50 μl .

5.15 Mikroskopia sił atomowych (AFM)

Pomiary AFM przeprowadzono za pomocą mikroskopu NanoWizard IV produkcji firmy JPK (Berlin, Niemcy) w trybie kontaktu przerywanego (ang. air-contact, AC). Do analizy próbek użyto dźwignie TAP190AL-G pochodzącej od Ted Pella Inc. (Redding, Kalifornia, USA). Dźwignie te posiadają powłokę aluminiową o właściwościach refleksyjnych, częstotliwość rezonansową 190 kHz oraz stałą sprężystości 48 N/m. Próbkę rozcieńczano 100- lub 1000-krotnie, w zależności od jakości uzyskiwanego obrazu, a następnie nanoszono je na świeżo oczyszczoną powierzchnię miki i pozostawiano do wyschnięcia. Obrazy AFM rejestrowano w dwóch skalach: skany orientacyjne wykonywano na obszarze $10 \times 10 \mu\text{m}$ z rozdzielczością 256×256 pikseli, natomiast skany powiększone wykonywano na wybranych fragmentach o rozmiarach rzędu kilku mikrometrów z rozdzielczością 512×512 pikseli. Szybkość skanowania wynosiła 0,07–0,20 linii/s. Uzyskane obrazy analizowano za pomocą oprogramowania Gwyddion w wersji 2.55 (Czech Academy of Sciences, Praga, Czechy) [238].

5.16 Nanospektroskopia w podczerwieni AFM-IR (NanoIR)

Pomiarów dokonano przy użyciu systemu nanoIR2 (Bruker Nano Surfaces, Billerica, Massachusetts, USA), integrującego podczas jednego pomiaru spektroskopię w podczerwieni z mikroskopią sił atomowych (AFM-IR). Do analiz wykorzystano próbki HCC o stężeniu wyjściowym 3 mg/ml, inkubowane w obecności nanocząstek. Przed pomiarami roztwory rozcieńczano 100–1000-krotnie i naniesiono na gładkie podłoża krzemowe pokryte warstwą złota. Widma rejestrowano w zakresie $1720\text{--}1580 \text{ cm}^{-1}$ w wybranych punktach próbki, co umożliwiała równoczesne pozyskiwanie danych widmowych i topograficznych z rozdzielczością nanometryczną. Zarejestrowane dane wygładzano metodą Savitzky'ego-Golaya. Uzyskane dane opracowywano przy użyciu oprogramowania AnalysisStudio (Bruker Nano Surfaces, Billerica, Massachusetts, USA) oraz PeakFit v 4.12 (Systat Software, San Jose, Kalifornia, USA).

5.17 Analiza termicznej stabilności białek

Próbki monomerycznej formy HCC przygotowano w stężeniach 30 μM (0,4 mg/ml), 60 μM (0,8 mg/ml) oraz 90 μM (1,2 mg/ml), natomiast dimeru HCC w stężeniach 15 μM (0,4 mg/ml), 30 μM (0,8 mg/ml) oraz 45 μM (1,2 mg/ml) w buforze 20 mM TRIS o pH 7. W próbkach zawierających nanocząstki CuO zastosowano stężenia odpowiednio 12 $\mu\text{g/ml}$ (monomer) oraz 6 $\mu\text{g/ml}$ (dimer), zaś w obecności jonów CuCl_2 – 60 μM dla monomeru oraz 30 μM dla dimeru. Do wszystkich próbek dodano barwnik SYPRO Orange w końcowym stężeniu 5 \times , uzyskanym z roztworu 100 \times , po czym inkubowano je przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Następnie próbki nanoszono na płytkę 96-dołkową w objętości 25 μl na dołek. Jako kontrolę zastosowano bufor z

barwnikiem bez dodatków. Dane następnie analizowano w środowisku Python, obliczając pierwszą pochodną sygnału metodą gradientu numerycznego (numpy.gradient) w celu wyznaczenia temperatury topnienia (T_m).

5.18 Testy przeżywalności komórek (WST-1)

Wpływ nanocząstek oraz agregatów HCC na proliferację komórek neuroblastomy SH-SY5Y oceniono za pomocą testu WST-1. Komórki nowotworowe hodowano w płytkach 96-dołkowych w liczbie 8×10^3 komórek na dołek. Po 24 godzinach inkubacji dodawano nanocząstki w stężeniach od 0,1 do 1000 $\mu\text{g/ml}$ w trzech powtórzeniach. Po kolejnych 24 godzinach dodawano 10 μl odczynnika WST-1 do każdego dołka i inkubowano przez 2 godziny w 37°C . Absorbancję mierzono przy długości fali 450 nm z referencyjnym filtrem 620 nm za pomocą czytnika płytek Anthos Zenyth 340rt (Anthos Labtec Instruments GmbH, Salzburg, Austria). Wyniki przedstawiono jako procent żywotności komórek względem kontroli negatywnej, podając średnią oraz odchylenie standardowe z trzech powtórzeń.

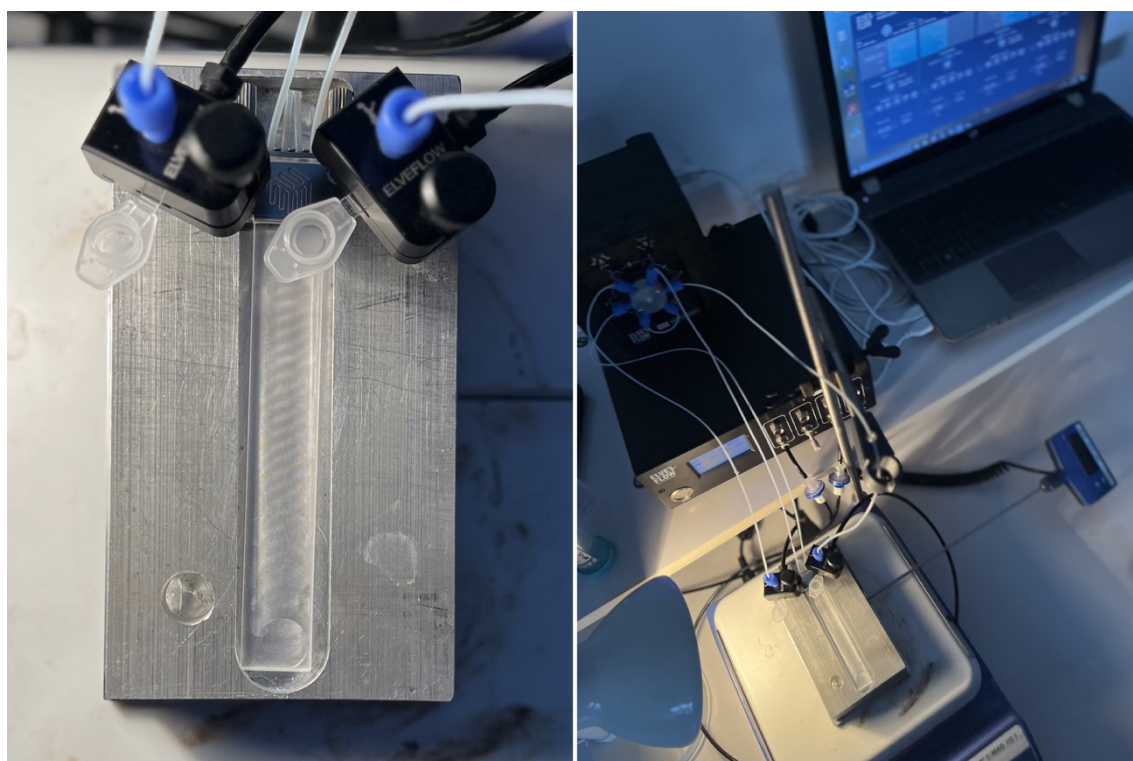
5.19 Oznaczanie reaktywnych form tlenu za pomocą sondy DCFH-DA

Produkcję reaktywnych form tlenu (ROS) w komórkach SH-SY5Y oceniono za pomocą testu DCFH-DA. Komórki posiano na płytkach 96-dołkowych w ilości 6×10^3 komórek na dołek i hodowano przez 24 h. Następnie komórki przemyto buforem HBSS (ang. Hank's Balanced Salt Solution, zawierającym m.in. NaCl, KCl, Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 i D-glukozę, pH 7,4) i inkubowano w 100 μM roztworze DCFH-DA w HBSS przez 30 minut w 37°C . Po ponownym przemyciu HBSS, komórki inkubowano przez kolejne 30 minut w świeżym buforze. Następnie na komórki nałożono próbki nanocząstek oraz HCC w stężeniach od 0,1 $\mu\text{g/ml}$ do 100 $\mu\text{g/ml}$ NPs, 0,5 μM – 7 μM HCC, 1 μM HCC + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs, 1 μM HCC + 1 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs, 1 μM HCC + 0,1 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs oraz kontrolę pozytywną (1 mM H_2O_2) i negatywną (HBSS). Po 30 minutach inkubacji w 37°C mierzono intensywność fluorescencji (wzb/emi: 485/530 nm) za pomocą czytnika płytek (FLUOstar Omega microplate reader, BMG LABTECH, Offenburg, Niemcy). Wyniki wyrażono jako stosunek intensywności fluorescencji próbek względem kontroli negatywnej i przedstawiono jako średnią \pm odchylenie standardowe z trzech powtórzeń.

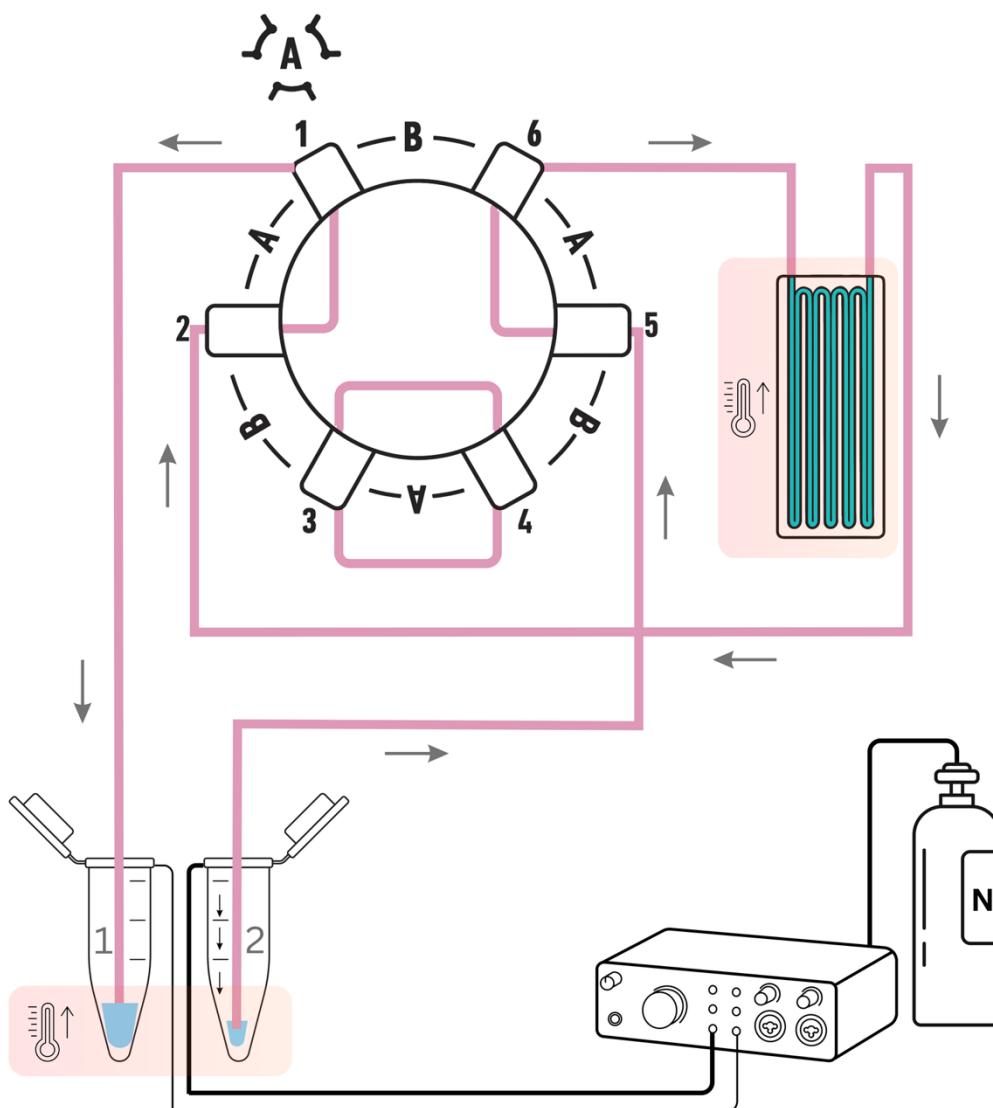
5.20 Przepływ mikrofluidyczny

Do przeprowadzenia cyrkulacyjnych eksperymentów mikroprzepływowych wykorzystano szklany chip mikrofluidyczny zakupiony w firmie Dolomite Microfluidics (Canterbury, Wielka Brytania). Chip posiada pojedynczy kanał o długości 5 metrów, ułożony w kształt serpentyny, z przekrojem prostokątnym o wymiarach 100 μm na 220 μm z zaokrąglonymi narożnikami. Całkowita objętość kanału wynosi około 90 μl . System mikrofluidyczny składał się z pompy, kontrolera ciśnienia OB1 (OB1PC) firmy Elvsys Microfluidic Innovation Centre (Paryż, Francja) oraz wspomnianego mikrochipa.

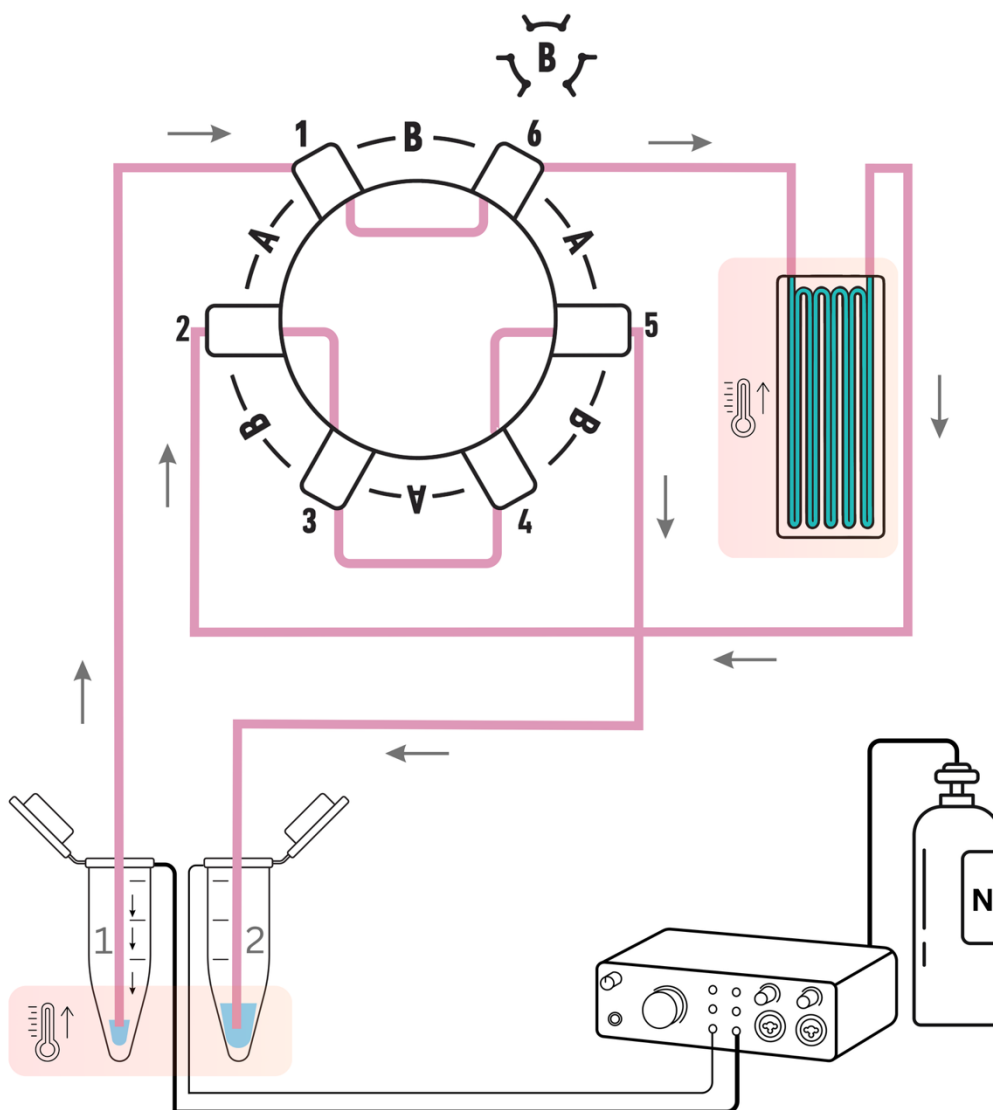
Kontroler OB1PC, zasilany czystym azotem (99,99%), umożliwia precyzyjną regulację ciśnienia w zakresie od 4 do 8000 mbar, które jest przykładane do próbki umieszczonej w probówce typu Eppendorf. Pod wpływem tego ciśnienia próbka jest transportowana przez przewody do mikrochipu. Dwukierunkowy przepływ próbki i jej ciągła cyrkulacja przez chip możliwe są dzięki zastosowaniu zaworu MUX Recirculation 6/2 – mikrofluidycznego zaworu o 6 portach i 2 pozycjach, który w połączeniu z kontrolerem OB1PC pozwala na recyrkulację cieczy w zamkniętym obiegu, automatyczne wprowadzanie niewielkich objętości próbek do strumienia cieczy oraz realizację długoterminowych eksperymentów. Zawór cechuje się wysoką kompatybilnością biologiczną i chemiczną. Jego konfiguracje umożliwiają sterowanie przepływem poprzez łączenie odpowiednich portów, co zapewnia elastyczność w sterowaniu kierunkiem przepływu. Próbka po przejściu przez chip jest zbierana w innej probówce Eppendorfa. Próbki oraz mikrochip były umieszczone na termoblokach grzewczych i utrzymywane w kontrolowanej temperaturze 47°C przez cały czas trwania eksperymentu. Układ mikroprzepływowo przedstawiono na rysunku 11, natomiast schemat konfiguracji zaworu MUX 6/2 w trybach A i B - na rysunkach 12 i 13. Przy przepływie 40 $\mu\text{l}/\text{min}$ średnia prędkość w kanale ($100 \times 220 \mu\text{m}$) wynosiła $\sim 3,0 \text{ cm/s}$, co odpowiada liczbie Reynoldsa $Re \approx 5$ i potwierdza laminarny charakter przepływu. Obliczone naprężenie ścinające wynosiło $\sim 1,45 \text{ Pa}$.



Rysunek 11. Układ mikrofluidyczny zastosowany w badaniach. Lewa część: zbliżenie chipa mikroprzepływowego umieszczonego w bloku grzewczym. Prawa część: stanowisko eksperymentalne z kontrolerem przepływu, zaworem oraz komputerem z oprogramowaniem sterującym.



Rysunek 12. Schemat mikroprzepływowego układu cyrkulacyjnego z zaworem MUX 6/2 w konfiguracji A. W trybie A czysty azot (99,99%) generuje nadciśnienie w próbce nr 2, wymuszając przepływ próbki przez port 5 zaworu MUX do portu 6. Następnie ciecz przepływa przez mikroprzepływowy chip szklany, utrzymywany w kontrolowanej temperaturze, po czym – przechodząc przez pozostałe porty zaworu – trafia do próbki nr 1. Układ tworzy zamknięty obieg, umożliwiając wielokrotną cyrkulację tej samej próbki przez mikrochip.



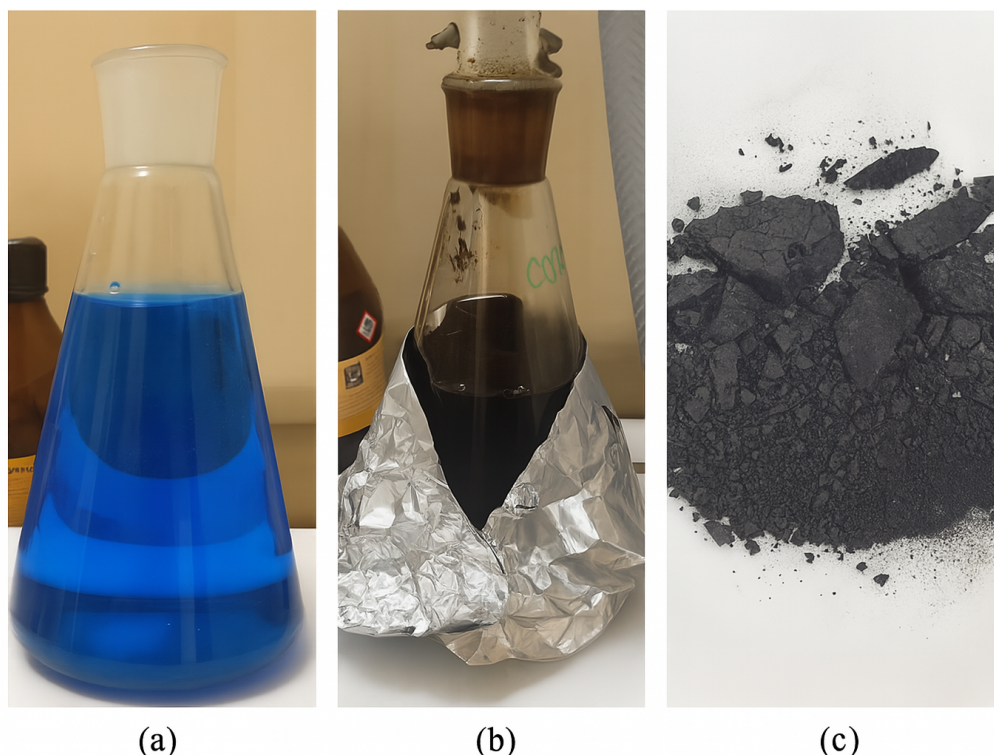
Rysunek 13. Schemat mikroprzepływowego układu cyrkulacyjnego z zaworem MUX 6/2 w konfiguracji **B**. W trybie **B** ciśnienie azotu przykładane jest do próbki nr 1, co skutkuje przepływem próbki przez port 1 zaworu do portu 6. Następnie strumień cieczy kierowany jest ponownie przez mikrochip i przechodząc przez kolejne porty zaworu, trafia do próbki nr 2. Naprzemienne przełączanie konfiguracji zaworu umożliwia odwracalne, zamknięte cykulowanie próbki pomiędzy dwiema próbkami z zachowaniem warunków temperaturowych.

6 Wyniki

6.1 Charakterystyka nanocząstek

6.1.1 Nanocząstki tlenku miedzi (II)

W ramach przeprowadzonych badań dokonano syntezy oraz kompleksowej charakterystyki nanocząstek tlenku miedzi (II) (CuO NPs). Celem tego etapu było potwierdzenie skuteczności procesu syntezy, opartej na metodzie zaproponowanej przez Ahamed oraz współpracowników [230], i określenie podstawowych właściwości strukturalnych, morfologicznych i fizykochemicznych otrzymanych nanocząstek.

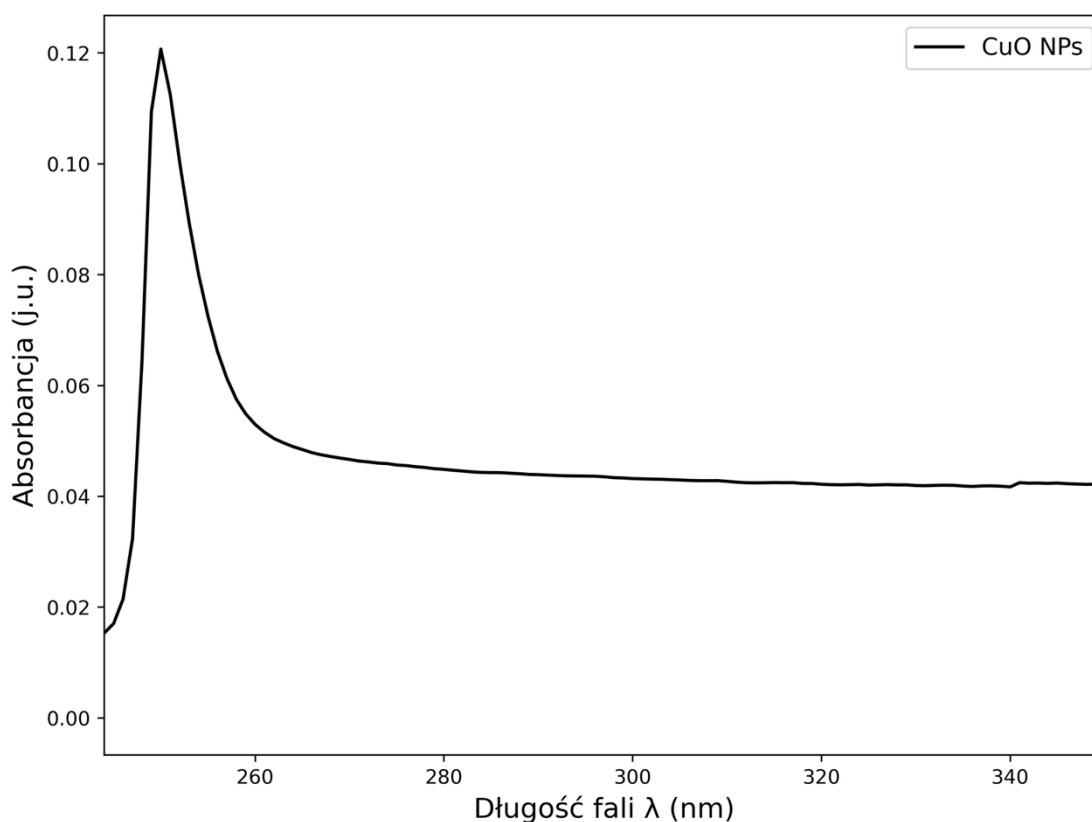


Rysunek 14. Etapy syntezy nanocząstek CuO: (a) roztwór prekursora miedzi (octanu miedzi (II)), (b) mieszanina reakcyjna w trakcie ogrzewania i redukcji, (c) otrzymany produkt tlenku miedzi (II) po zakończeniu syntezy i suszeniu.

Rysunek 14 przedstawia kolejne etapy procesu syntezy nanocząstek CuO (rozdział 5.4), uchwycone w postaci dokumentacji fotograficznej. Obrazuje on przemiany zachodzące podczas reakcji – od klarownego roztworu zawierającego prekursor miedzi, poprzez mieszaninę reakcyjną poddaną ogrzewaniu, aż po końcowy produkt w postaci ciemnego proszku.

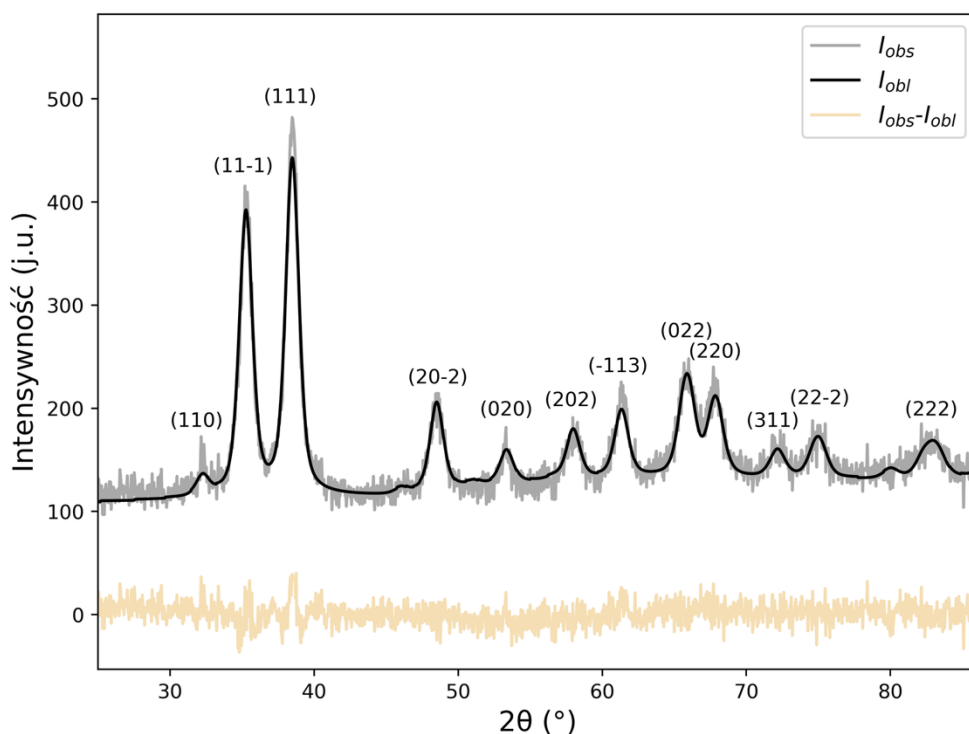
Widmo absorpcyjne w zakresie UV-Vis nanocząstek CuO (rysunek 15) wykazało pojedynczy, charakterystyczny pik przy ok. 250 nm, co jest zgodne z doniesieniami literaturowymi dla nanocząstek CuO [239]. Na tej podstawie można wnioskować o

dominującym udziale fazy CuO, bez istotnych ilości innych faz miedzi. Brak pików plazmonowego ~560 nm sugeruje brak znacznych ilości Cu⁰.



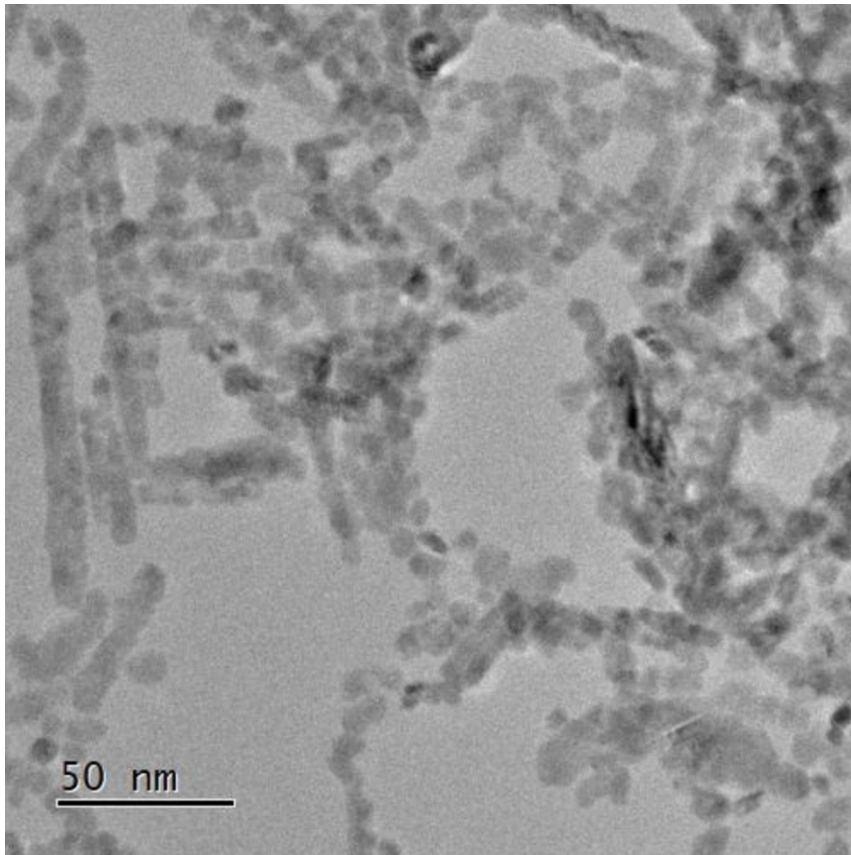
Rysunek 15. Widmo UV-Vis roztworu wodnego zsyntetyzowanych nanocząstek tlenku miedzi (II).

Choć spektroskopia UV-Vis pozwala na szybką identyfikację materiału i ocenę jego właściwości optycznych, to w celu jednoznacznej identyfikacji oraz potwierdzenia struktury krystalicznej konieczne było przeprowadzenie analizy dyfrakcyjnej. Analiza dyfraktogramu otrzymanego metodą dyfrakcji rentgenowskiej proszkowej (rysunek 16) potwierdziła jednofazowy charakter nanomateriału. Układ i intensywność pików dyfrakcyjnych odpowiadały strukturze krystalicznej tlenku miedzi (II) krystalizującego w układzie jednoskośnym (grupa przestrzenna $C2/c$), co świadczy o poprawnym przebiegu syntezy [230]. Analiza numeryczna metodą Rietvelda wykazała bardzo dobre dopasowanie modelu ($R_p = 8,47$; $R_{wp} = 9,57\%$; $\chi^2 = 0,71$), potwierdzając wysoką czystość fazową otrzymanych nanocząstek.

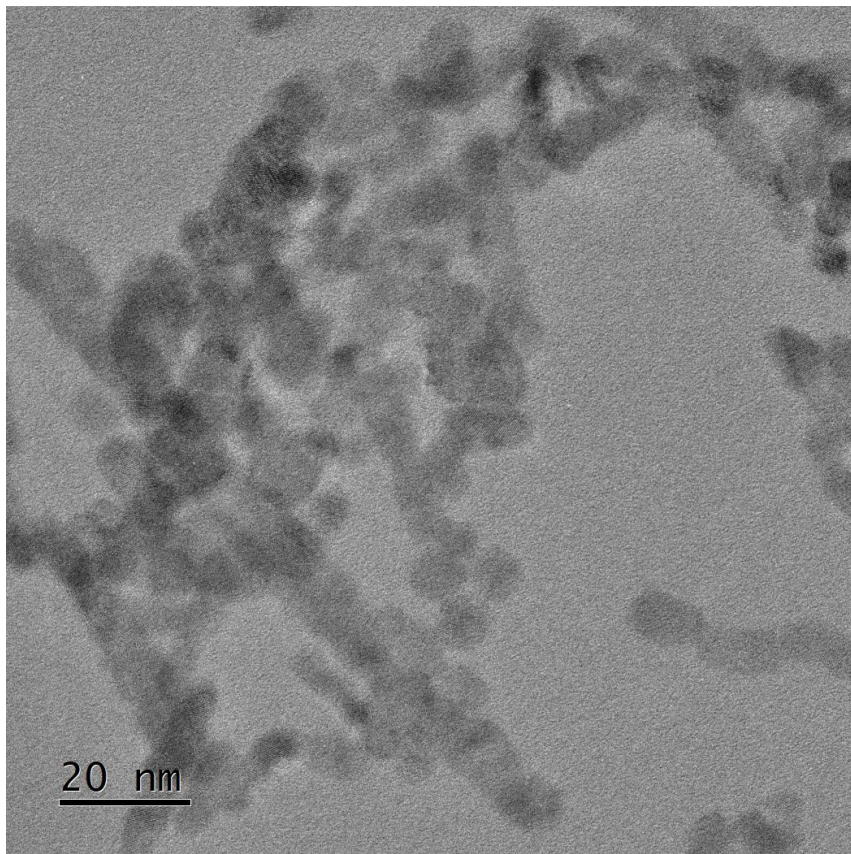


Rysunek 16. Dyfraktogram proszkowy dla zsyntetyzowanych nanocząstek tlenku miedzi (II). Kolorem szarym oznaczono dane eksperymentalne (I_{obs}), czarnym dopasowanie metodą Rietvelde (I_{obl}), a pomarańczowym różnice pomiędzy danymi eksperymentalnymi a obliczeniowymi ($I_{obs}-I_{obl}$).

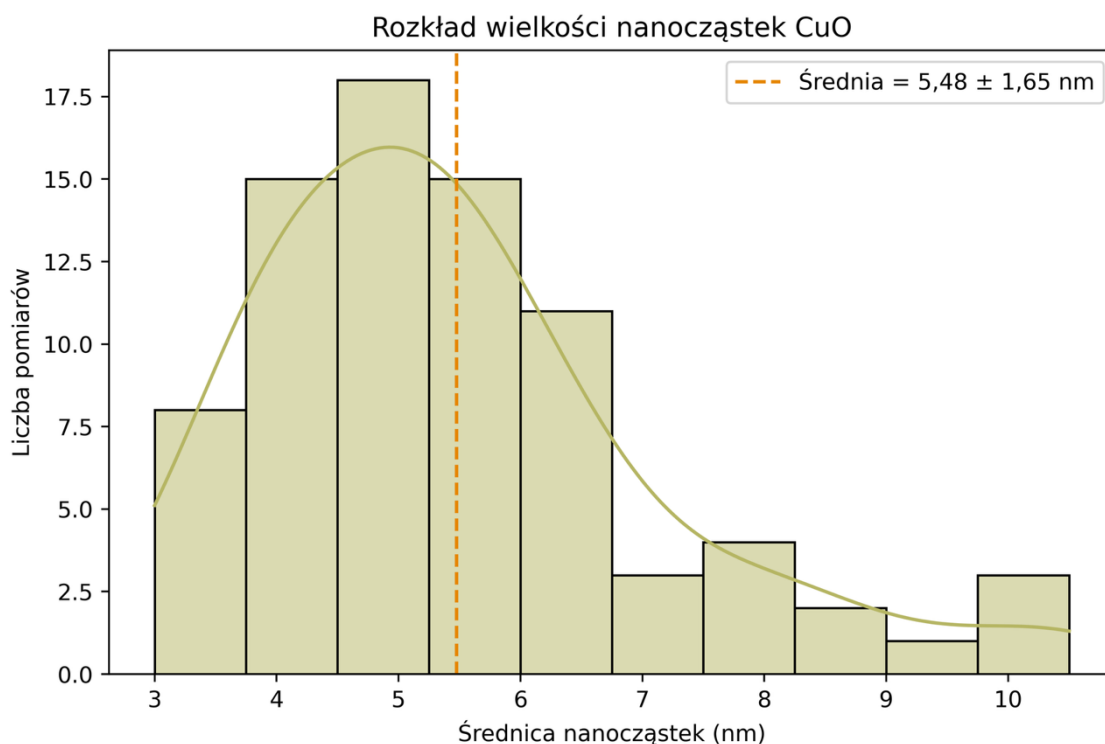
Analiza mikroskopii transmisyjnej pozwoliła (rysunki 17–18) na bezpośrednią ocenę kształtu i rozkładu wielkości nanocząstek CuO. Obserwowane cząstki tworzyły nieregularne aglomeraty, jednak w ich obrębie możliwe było wyróżnienie pojedynczych, dobrze zdefiniowanych nanostruktur. Ich morfologia wskazywała na nieregularny, aczkolwiek powtarzalny kształt, typowy dla nanocząstek otrzymywanych metodami osadzania chemicznego. Cząstki różniły się nieznacznie rozmiarami, co może wskazywać na umiarkowaną monodispersyjność próbki.



Rysunek 17. Zdjęcie TEM zsyntetyzowanych nanocząstek tlenku miedzi (II).



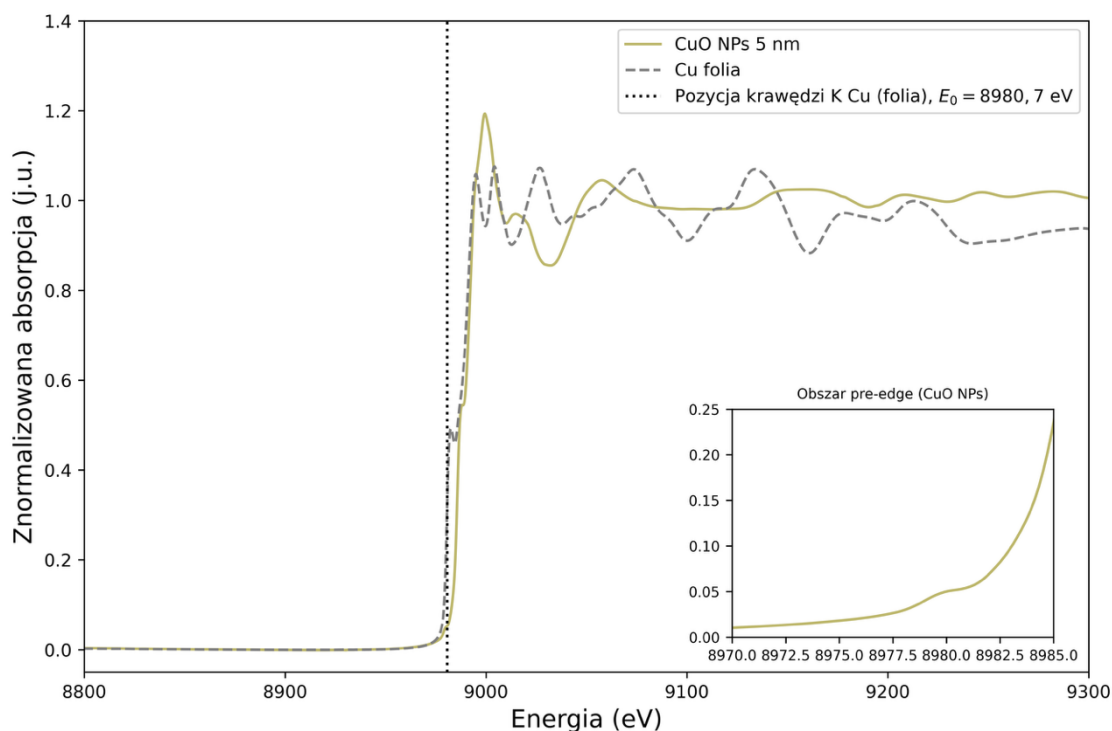
Rysunek 18. Zdjęcie TEM zsyntetyzowanych nanocząstek tlenku miedzi (II).



Rysunek 19. Histogram rozkładu wielkości nanocząstek CuO wyznaczonego na podstawie analizy obrazów TEM przy użyciu oprogramowania ImageJ [237].

W celu dokładniejszej analizy wielkości przeprowadzono pomiary bezpośrednio na obrazach TEM z wykorzystaniem programu ImageJ [237]. Pomiar 80 indywidualnych cząstek pozwolił określić średnią wielkość nanocząstek CuO na poziomie 5,48 nm, przy odchyleniu standardowym 1,65 nm. Choć wyniki te wskazują na pewien stopień zróżnicowania rozmiarów, główny rozkład koncentruje się w przedziale 4–6 nm, co sugeruje kontrolowany przebieg procesu syntezy. Rozkład wielkości cząstek został przedstawiony na histogramie (rysunek 19).

W celu uzyskania informacji na temat lokalnego otoczenia atomowego i stopnia utlenienia miedzi, wykorzystano rentgenowską spektroskopię absorpcyjną. Technika ta pozwala na uzyskanie szczegółowych danych strukturalnych i chemicznych, niedostępnych w klasycznych metodach, takich jak PXRD czy UV-Vis. Widmo XAS (rysunek 20), zarejestrowane w zakresie K-krawędzi miedzi (8980,5 eV), wykazało obecność charakterystycznego pików przedkrawędziowego oraz przebieg krawędzi absorpcji zgodny z danymi literaturowymi dla tlenku miedzi (II) (CuO) [240]. Uzyskany profil absorpcji potwierdza, że dominującą formą chemiczną miedzi w badanym materiale jest tlenek Cu (II). Brak przesłanek wskazujących na obecność innych form utlenienia sugeruje wysoką jednorodność chemiczną otrzymanych nanocząstek.

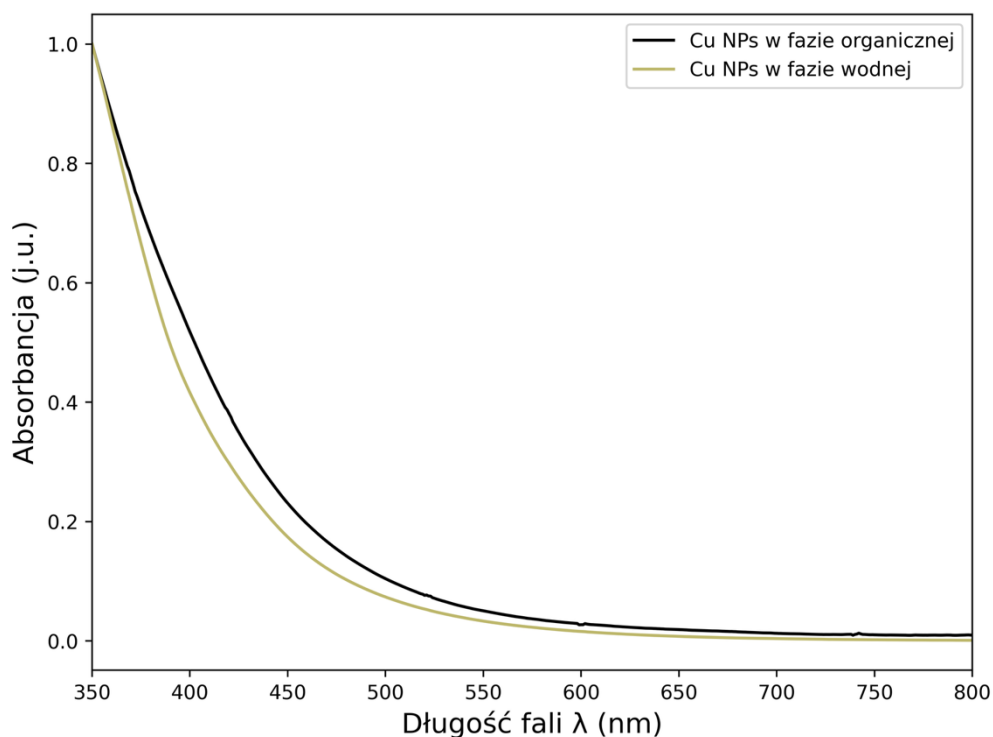


Rysunek 20. Widmo absorpcji promieni rentgenowskich nanocząstek CuO.

Zastosowanie zestawu uzupełniających się technik analitycznych umożliwiło kompleksową ocenę struktury, składu chemicznego oraz rozmiaru uzyskanych nanocząstek CuO. Otrzymany materiał został jednoznacznie scharakteryzowany jako tlenek miedzi (II) o stabilnej morfologii nanometrycznej i strukturze krystalicznej odpowiadającej układowi jednoskośnemu. Widmo XAS potwierdziło stan utlenienia Cu^{2+} oraz brak sygnałów charakterystycznych dla innych form miedzi, co wskazuje na wysoką czystość chemiczną i strukturalną otrzymanych nanocząstek.

6.1.2 Nanocząstki miedzi

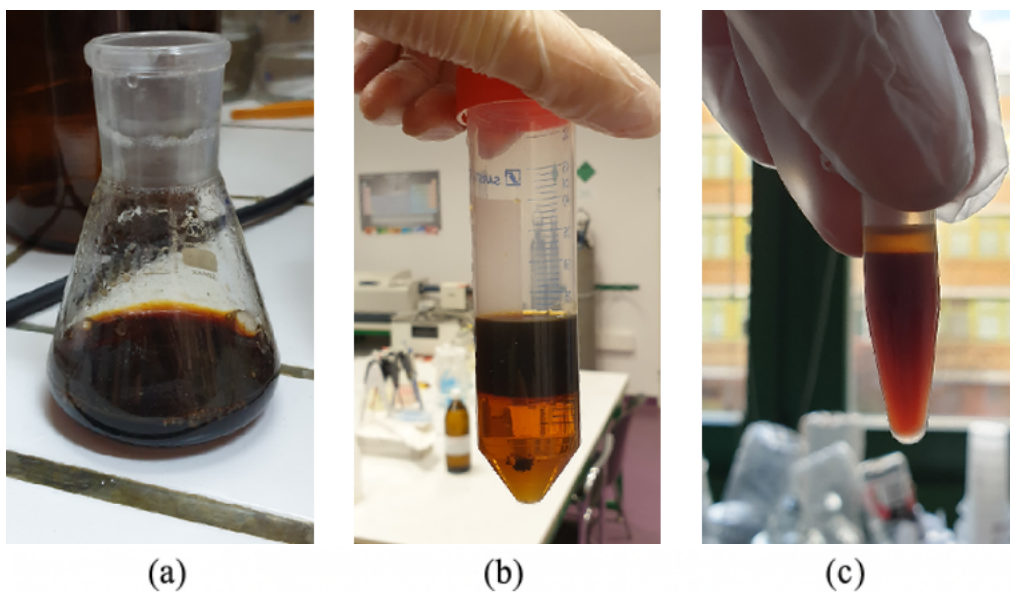
Nanocząstki miedzi (Cu NPs) uzyskane samodzielnie poddano szczegółowej charakterystyce fizykochemicznej z wykorzystaniem spektroskopii UV-Vis, mikroskopii sił atomowych (AFM), dynamicznego rozpraszania światła (DLS) oraz spektroskopii absorpcji promieniowania rentgenowskiego (XAS). Celem analiz było potwierdzenie obecności Cu^0 , ocena rozmiarów i morfologii nanocząstek, a także weryfikacja stabilności układu w różnych fazach.



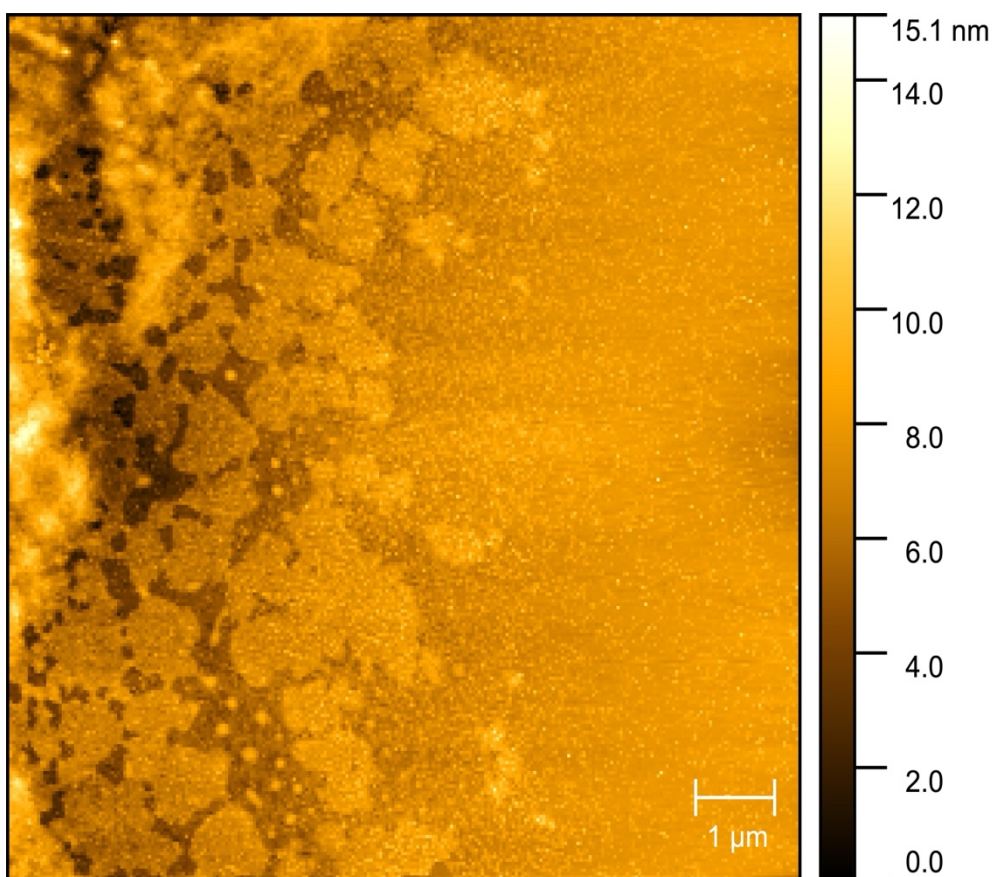
Rysunek 21. Widmo UV-Vis zsyntetyzowanych samodzielnie nanocząstek miedzi w fazie organicznej oraz w fazie wodnej.

Widmo UV-Vis (rysunek 21) zarejestrowane dla zsyntezowanych nanocząstek miedzi nie wykazuje pasma powierzchniowego rezonansu plazmowego (SPR) w zakresie 570–580 nm, co – zgodnie z danymi literaturowymi – może wynikać z ich niewielkiego rozmiaru (<4 nm) [231]. Brak istotnych zmian po przeniesieniu do fazy wodnej wskazuje również na dobrą stabilność układu.

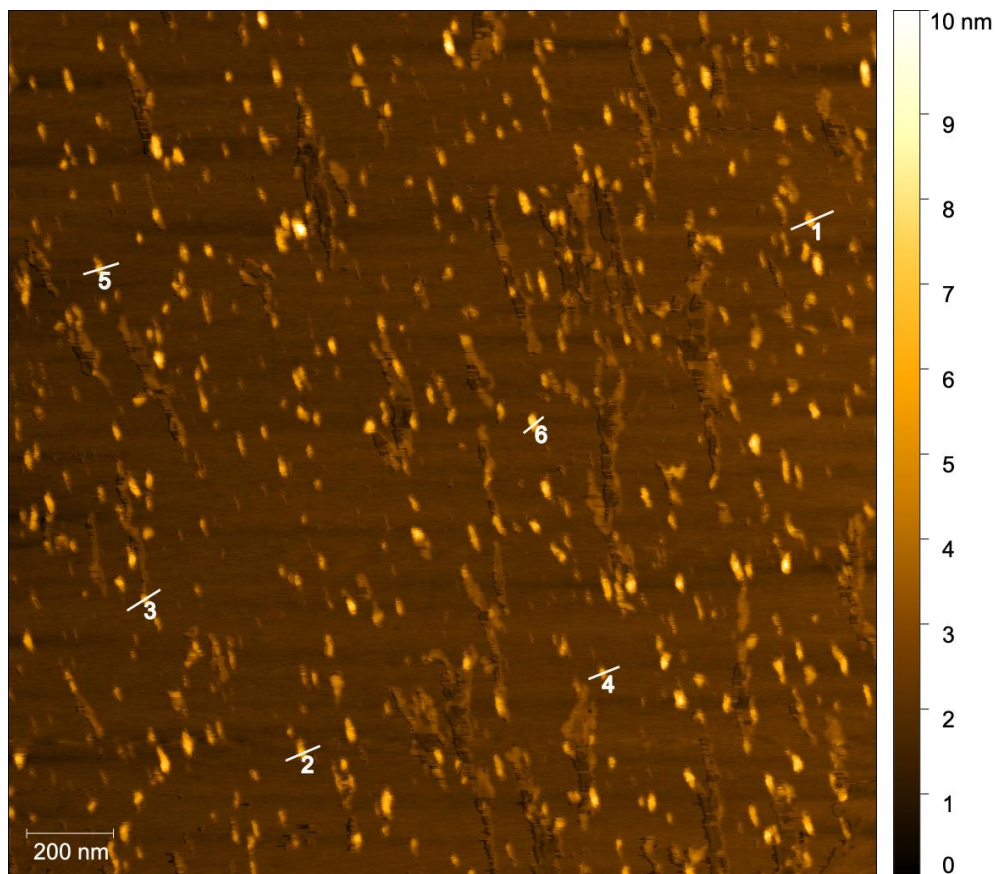
Rysunek 22 ilustruje proces stabilizacji nanocząstek miedzi poprzez ich przeniesienie z fazy reakcyjnej do środowiska organicznego, a następnie ich transfer z powrotem do fazy wodnej. Widoczna zmiana barwy roztworów odzwierciedla obecność koloidalnych nanocząstek Cu⁰. Przeniesienie do fazy organicznej umożliwia skuteczną ochronę cząstek przed utlenianiem, co pozwala na zachowanie ich struktury metalicznej. Obecność intensywnej barwy brunatnej wskazuje na zachowanie dyspersji nanocząstek w zawiesinie.



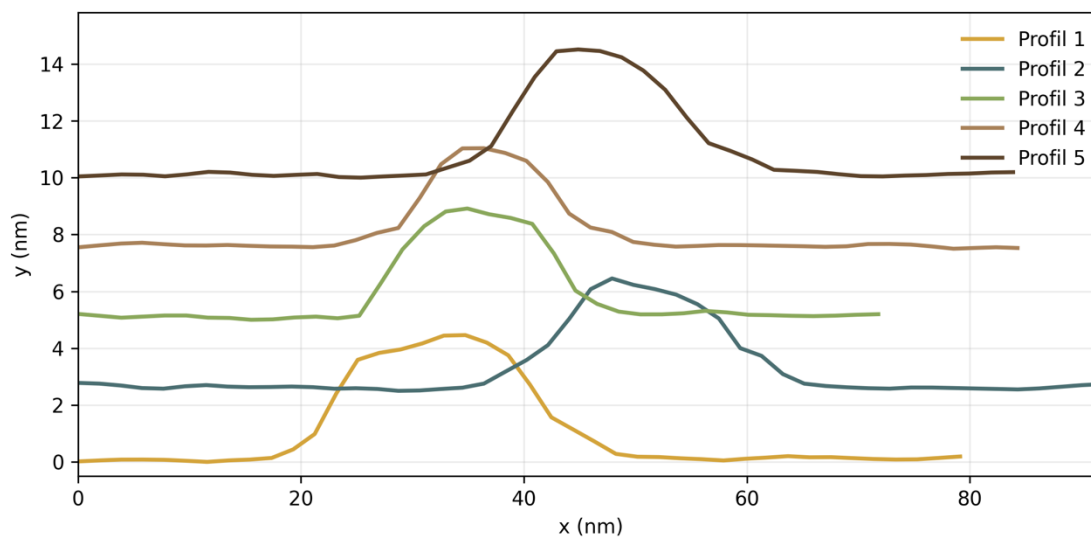
Rysunek 22. Synteza nanocząstek miedzi, a) nanocząstki miedzi bezpośrednio po syntezie, b) nanocząstki miedzi przeniesione do fazy organicznej w celu ich stabilizacji, c) nanocząstki miedzi przeniesione ponownie z fazy organicznej do fazy wodnej.



Rysunek 23. Obraz AFM nanocząstek miedzi po przeniesieniu ich z fazy organicznej do fazy wodnej.

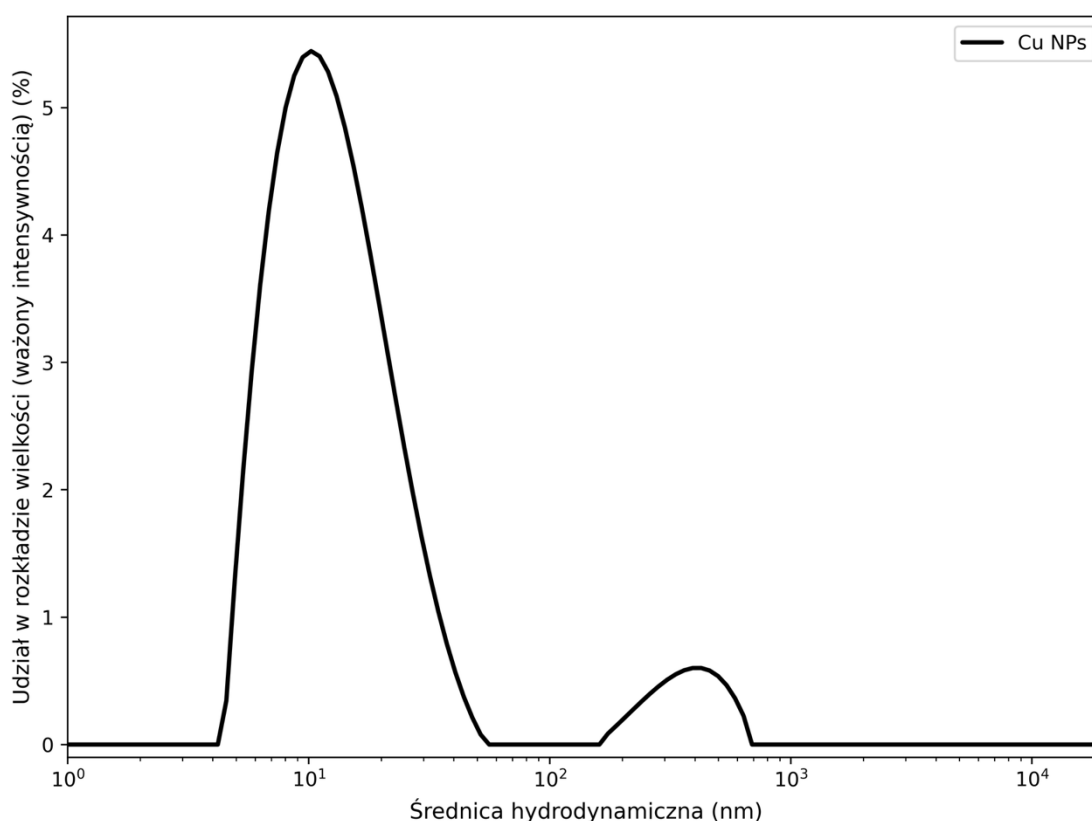


Rysunek 24. Zdjęcie AFM zsyntetyzowanych nanocząstek miedzi po przeniesieniu ich z fazy organicznej do fazy wodnej. Zaznaczone przekroje nanocząstek analizowano na rysunku 25.



Rysunek 25. Profile wysokości wykonane wzdłuż przekrojów wybranych nanocząstek na rysunku 24, przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności, obrazujące ich wymiary.

Analiza obrazów nanocząstek miedzi uzyskanych metodą mikroskopii sił atomowych (AFM), przedstawionych na rysunku 23, wykazała obecność obszarów o zróżnicowanej morfologii, z wyraźnymi skupiskami cząstek sugerującymi lokalną agregację. Z kolei bardziej szczegółowe obrazy AFM (rysunek 24) oraz analizy profili wysokości (rysunek 25) wskazują na obecność licznych, indywidualnych nanostruktur o wysokości rzędu kilku nanometrów (ok. 2–4 nm). Wartości te wyznaczano jako różnicę pomiędzy maksimum profilu a indywidualnym poziomem podłoża. Uzyskane dane potwierdzają niewielkie rozmiary nanocząstek, co pozostaje zgodne z wynikami spektroskopii UV–Vis, w której nie zaobserwowano charakterystycznego pasma rezonansu plazmonowego - zgodnie z danymi literaturowymi niewystępującego dla cząstek o tak małych rozmiarach [231].

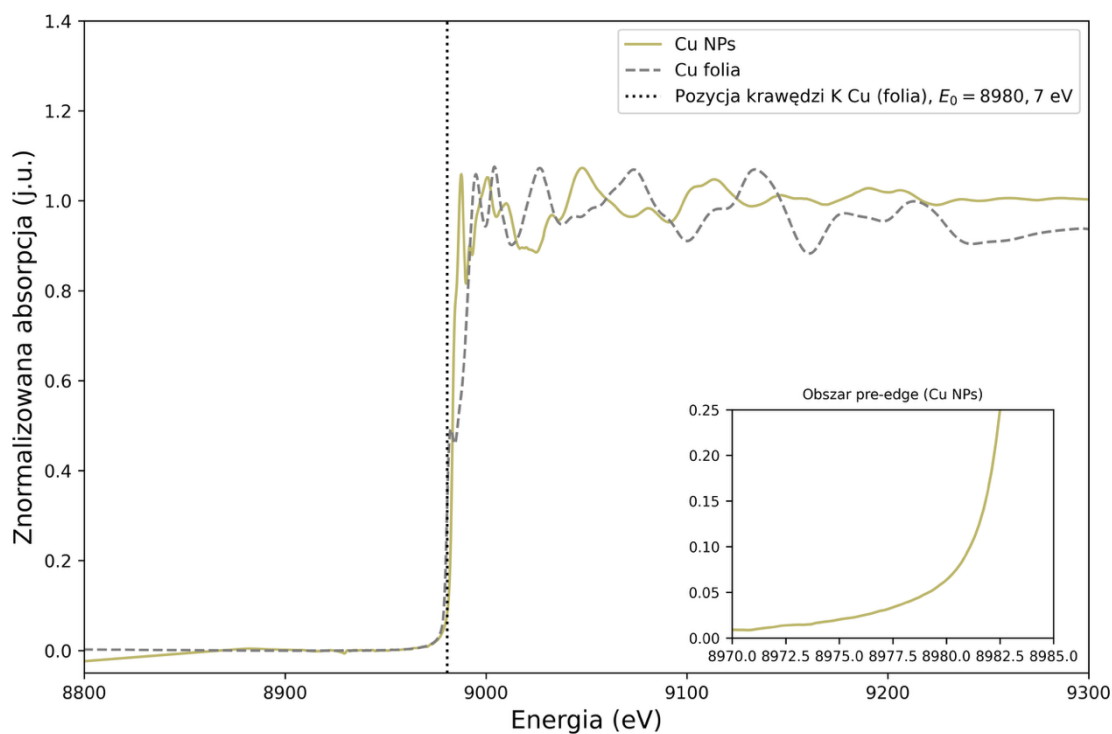


Rysunek 26. Rozkład wielkości ważony intensywnością zsyntetyzowanych nanocząstek miedzi w fazie organicznej otrzymany metodą DLS. Rozkład przedstawiono na skali logarytmicznej.

Tabela 1. Zestawienie wyników uzyskanych za pomocą techniki DLS dla zsyntetyzowanych nanocząstek miedzi.

Średnica hydrodynamiczna [nm]	Współczynnik dyfuzji [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Indeks polidispersyjności [%]	Wartość pik 1 [nm]	Wartość pik 2 [nm]
13,05	15	23,2	13,94	381,6

Pomiar dynamicznego rozpraszania światła (DLS) wykonany dla nanocząstek miedzi zawieszonych w cykloheksanonie (rysunek 26, tabela 1) wykazał rozkład wielkości cząstek z głównym pikiem przy 13 nm oraz dodatkowym sygnałem w zakresie ~381 nm, odpowiadającym większym agregatom. Uzyskane wyniki wskazują na częściową aglomerację w układzie, przy jednoczesnej znaczącej obecności populacji pojedynczych cząstek. Rozkład wielkości cząstek przedstawiono na skali logarytmicznej.



Rysunek 27. Widmo absorpcji promieni rentgenowskich nanocząstek Cu w fazie organicznej.

Widmo XAS zarejestrowane w zakresie K-krawędzi absorpcji (rysunek 27) wykazało sygnał typowy dla miedzi w zerowym stopniu utlenienia Cu^0 , bez obecności piku przedkrawędziowego charakterystycznego dla form Cu^{2+} . Wynik ten potwierdza, że otrzymane nanocząstki zachowały metaliczny charakter i nie uległy utlenieniu.

Uzyskane wyniki jednoznacznie potwierdzają, że zastosowana metoda umożliwia skuteczną syntezę nanocząstek miedzi w zerowym stopniu utlenienia (Cu^0) w środowisku organicznym oraz ich stabilne przeniesienie do fazy wodnej. Warto podkreślić, że uzyskanie trwałych, metalicznych nanocząstek miedzi o bardzo małych rozmiarach stanowi istotne wyzwanie eksperymentalne, ze względu na ich wysoką podatność na utlenianie prowadzące do powstawania tlenków Cu_2O i CuO . Zachowanie formy Cu^0 wymaga precyzyjnej kontroli warunków syntezy – co w tym przypadku udało się skutecznie zrealizować.

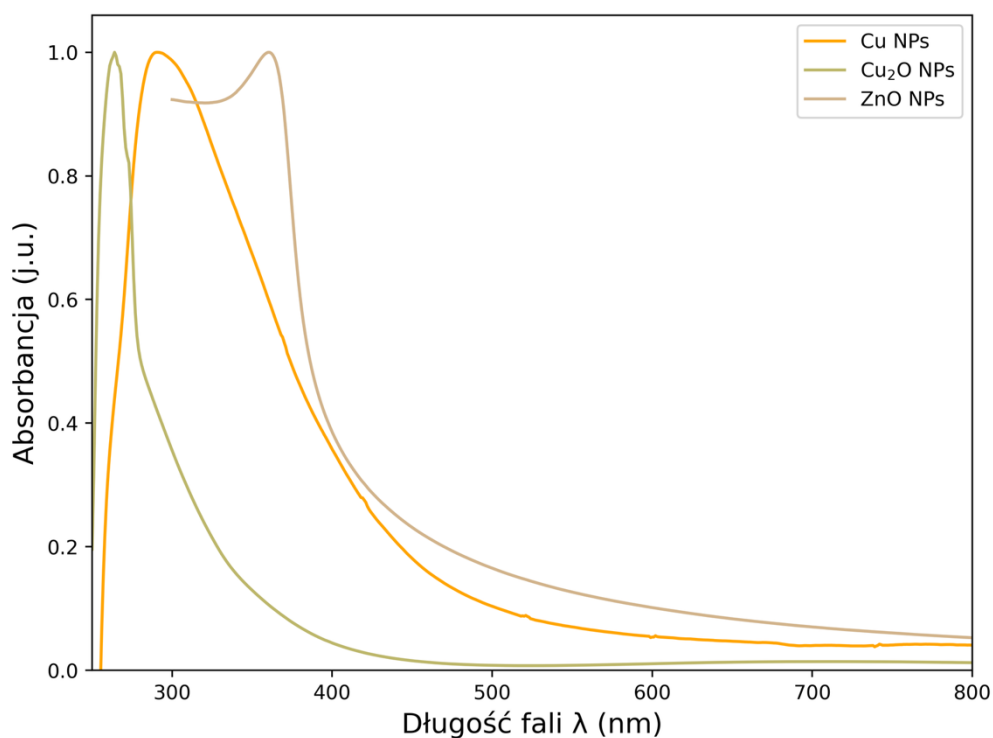
6.1.3 Nanocząstki komercyjne

W związku z licznymi próbami optymalizacji warunków syntezy nanocząstek miedzi w zerowym stopniu utlenienia – procesu wymagającego ze względu na wysoką reaktywność tego materiału, w tym jego podatność na utlenianie – podjęto decyzję o częściowym włączeniu do analiz również komercyjnie dostępnych nanomateriałów. Działanie to miało na celu przyspieszenie realizacji kolejnych etapów projektu oraz umożliwienie porównania właściwości fizykochemicznych materiałów syntezowanych samodzielnie z ich rynkowymi odpowiednikami.

W ramach pracy wykorzystano i testowano wstępnie osiem typów komercyjnych nanomateriałów zakupionych w firmie Sigma-Aldrich, obejmujących nanocząstki Cu, CuO, Cu₂O, ZnO oraz Zn dostępne w kilku wariantach rozmiarowych. Zastosowanie tak szerokiego zestawu materiałów pozwoliło nie tylko na ocenę właściwości nanocząstek miedzi otrzymywanych w syntezach własnych na tle ich rynkowych odpowiedników, lecz także na uwzględnienie roli cynku, który - podobnie jak miedź - pełni istotną funkcję w homeostazie neuronalnej, a jego zaburzenia są powiązane z procesami neurodegeneracji (szczegółowo omówione w Rozdziale 3.2). Włączenie obu metali do analiz miało umożliwić uzyskanie szerszego wglądu w mechanizmy ich oddziaływania z białkiem modelowym, tj. ludzką cystatyną C, oraz ocenę różnic wynikających zarówno z natury danego metalu, jak i właściwości fizykochemicznych zastosowanych nanocząstek. Zestawienie rodzaju, rozmiaru, producenta oraz kodów produktu wszystkich wykorzystanych materiałów przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2. Zestawienie komercyjnych nanomateriałów wykorzystanych w badaniach, wraz z informacją o ich rodzaju, rozmiarze, producencie i kodzie produktu.

Rodzaj	Rozmiar	Firma	Kod produktu
Cu	25 nm	Sigma-Aldrich	774081
Cu	40-60 nm	Sigma-Aldrich	774111
CuO	10-12 × 75-100 nm	Sigma-Aldrich	792004
CuO	<50 nm	Sigma-Aldrich	544868
Cu ₂ O	<350 nm	Sigma-Aldrich	678945
ZnO	<100 nm	Sigma-Aldrich	544906
ZnO	<50 nm	Sigma-Aldrich	677450
Zn	40-60 nm	Sigma-Aldrich	578002

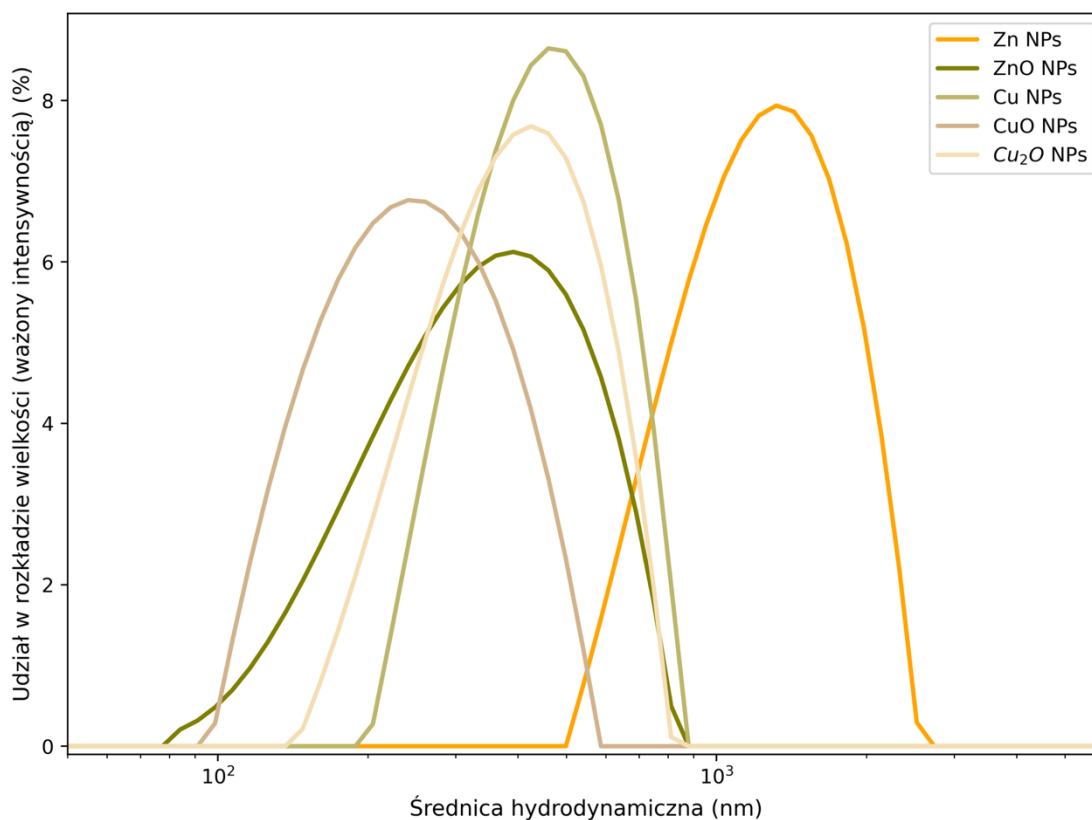


Rysunek 28. Znormalizowane widma absorpcyjne UV-Vis komercyjnych nanocząstek miedzi, tlenku miedzi (I) oraz tlenku cynku.

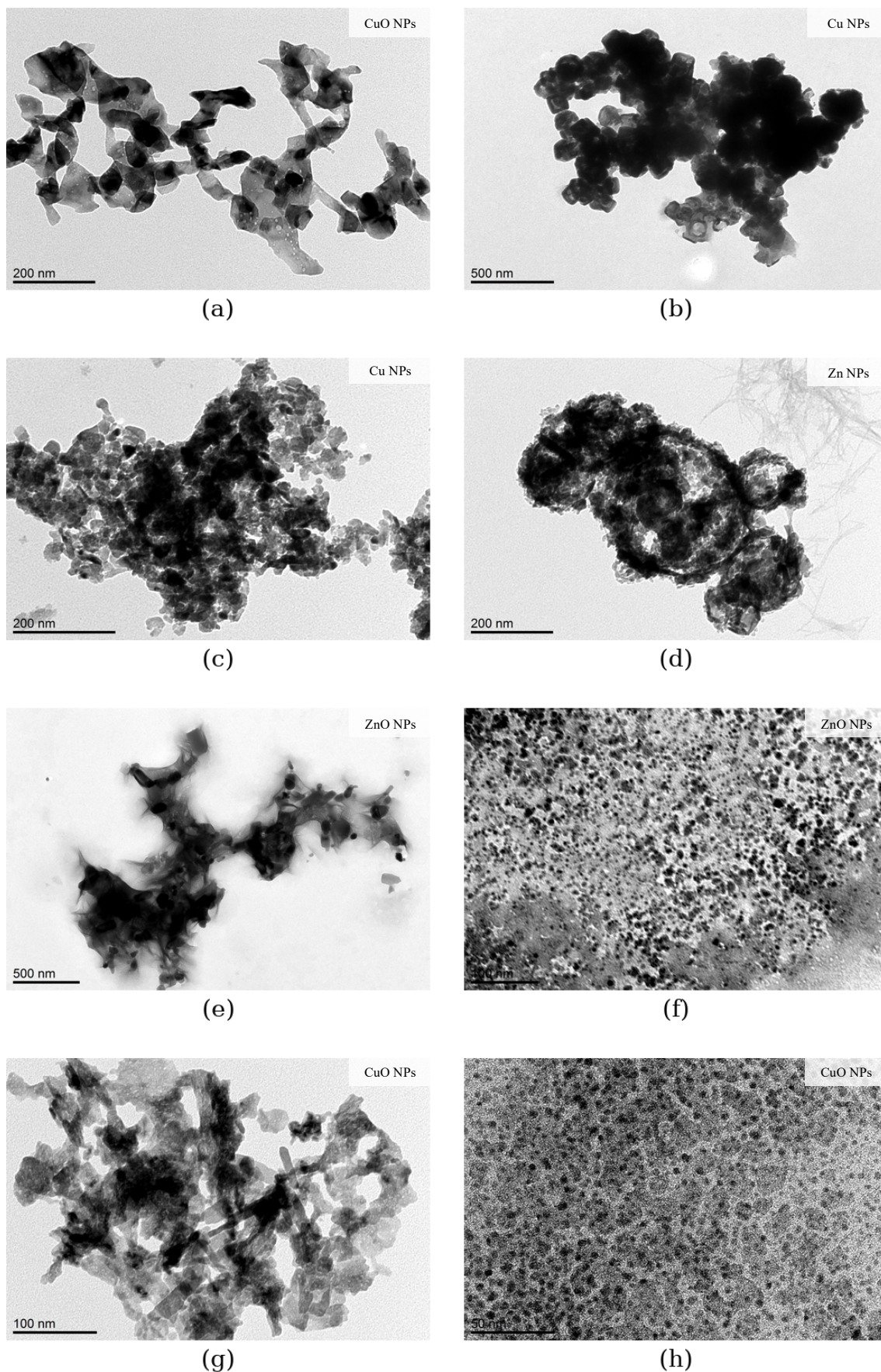
Wstępna charakterystyka materiałów komercyjnych objęła pomiary spektroskopii UV-Vis (rysunek 28) oraz analizę metodą dynamicznego rozpraszania światła (DLS) (rysunek 29, tabela 3). Rozkład wielkości cząstek przedstawiono na skali logarytmicznej. Uzyskane wyniki niestety ujawniły obecność szerokich, rozmytych pasm absorpcyjnych oraz znaczną aglomerację cząstek w roztworach - nawet po próbach ich redispersji w różnych rozpuszczalnikach z pomocą sonikacji. Takie obserwacje wskazują na niską jakość dyspersji oraz możliwą obecność niejednorodnych frakcji rozmiarowych. Z tego względu, na rysunku 28 przedstawiono jedynie trzy widma nanocząstek Cu, Cu₂O oraz ZnO, reprezentatywne dla najlepiej zdyspergowanych próbek, w przypadku których możliwa była wiarygodna interpretacja uzyskanych sygnałów absorpcyjnych.

Tabela 3. Zestawienie parametrów charakteryzujących badane nanocząstki komercyjne miedzi, tlenku miedzi (I), tlenku miedzi (II), cynku oraz tlenku cynku w różnych rozpuszczalnikach. Parametry uzyskane w oparciu o wyniki DLS przy pomocy programu Kalliope. Dla każdej próbki przetestowano kilka rozpuszczalników, jednak tylko te, w których możliwe było uzyskanie stabilnej dyspersji odpowiedniej do pomiarów DLS, zostały uwzględnione w tabeli.

Nanocząstki	Rozpuszczalnik	Średnica hydrodynamiczna [nm]	Współczynnik dyfuzji [$\mu\text{m}^2/\text{s}$]	Indeks polidispersyjności [%]	Wartość pików [nm]
Cu	Woda	483,7	1,0	23,4	465,0
Cu	Etanol	551,6	0,7	25,1	542,1
Cu	Izopropanol	200,2	0,8	59,8	176,5
Cu_2O	Etanol	969,5	0,4	169,8	619,1
CuO	Woda	241,0	2,0	21,7	261,2
CuO	Izopropanol	603,9	0,3	18,4	529,7
ZnO	Woda	334,5	1,5	24,5	363,1
Zn	Woda	1587,1	0,3	25,0	1302,1



Rysunek 29. Dystrybucja rozmiarów komercyjnych nanocząstek miedzi, tlenku miedzi (I), tlenku miedzi (II), cynku oraz tlenku cynku, wyznaczone w oparciu o badania DLS. Wykresy przedstawiają wyniki dla nanocząstek zawieszonych w wodzie, z wyjątkiem Cu_2O , które analizowano w etanolu. Rozkład przedstawiono na skali logarytmicznej.



Rysunek 30. Zdjęcia TEM nanocząstek: **a)** CuO <50, **b)** Cu 25, **c)** Cu 40–60, **d)** Zn 40–60, **e)** ZnO <100, **f)** ZnO <50, **g)** CuO nanotubes (10–12 × 75–100), **h)** CuO <350 (nm)

Analiza mikroskopowa stanowiła istotne uzupełnienie wyników badań spektroskopowych, potwierdzając niską jakość większości testowych próbek komercyjnych. Obrazy TEM (rysunek 30) ujawniły znaczną zmienność morfologiczną pomiędzy poszczególnymi materiałami – od względnie jednorodnych nanocząstek o wyraźnie zarysowanych konturach, po gęsto upakowane, nieregularne aglomeraty utrudniające jednoznaczną identyfikację struktur.

Szczególne niekorzystnie wypadły próbki zawierające miedź metaliczną (Cu^0), które podczas schnięcia na siatkach TEM ulegały częściowemu utlenieniu. Prowadziło to do powstawania nieregularnej, skorupkowatej warstwy, co znacząco obniżało jakość obrazowania. Obserwowane zmiany świadczą o niewystarczającej stabilizacji chemicznej oraz braku skutecznej ochrony powierzchni przed procesami utleniania, co dyskwalifikuje je do dalszych badań w charakterze nanostruktur modelowych. Z kolei nanocząstki cynku oraz tlenku cynku, mimo deklarowanych przez producentów rozmiarów w zakresie 50–100 nm, tworzyły skupiska znacznie przekraczające te wartości. Może to świadczyć o ich wysokiej skłonności do wtórnej aglomeracji. Rysunek 30 prezentuje zestaw obrazów TEM ośmiu komercyjnych próbek, obejmujących m.in. tlenek miedzi (II) (CuO) o różnych deklarowanych rozmiarach, nanocząstki miedzi metalicznej (25 i 40–60 nm), cynku oraz tlenku cynku (ZnO). Uwzględniono również próbkę CuO w postaci nanorurek (średnica 10–12 nm, długość 75–100 nm) jako uzupełnienie późniejszych badań z udziałem białek. Celem jej włączenia była ocena wpływu morfologii – w szczególności wydłużonego kształtu – na potencjalną agregację białka.

Wszystkie komercyjne nanocząstki zostały również poddane analizie z wykorzystaniem spektroskopii absorpcyjnej promieniowania rentgenowskiego (XAS). Jednak ze względu na znaczne zróżnicowanie morfologiczne oraz niską jakość części próbek – w tym wysoką agregację i niejednorodność – uzyskane dane nie zostały przedstawione ani uwzględnione w dalszych analizach.

6.2 Selekcja nanocząstek do dalszych badań

Mimo początkowych założeń dotyczących możliwości wykorzystania materiałów komercyjnych, przeprowadzona charakterystyka fizykochemiczna ujawniła szereg istotnych ograniczeń dyskwalifikujących je z dalszych badań. W szczególności, analiza TEM wykazała znaczną aglomerację, nieregularność rozmiarów oraz brak zgodności deklarowanych parametrów z rzeczywistą morfologią nanocząstek. Dodatkowo, nanocząstki były często zagregowane, co utrudniało ich efektywną redyspergację oraz zaburzało pomiary spektroskopowe i rozproszeniowe (UV-Vis, DLS). Próby rozbicia agregatów za pomocą sonikacji nie przyniosły zadowalających rezultatów, a określenie rzeczywistego rozkładu rozmiarów - nawet przy zastosowaniu różnych rozpuszczalników – okazało się praktycznie niemożliwe.

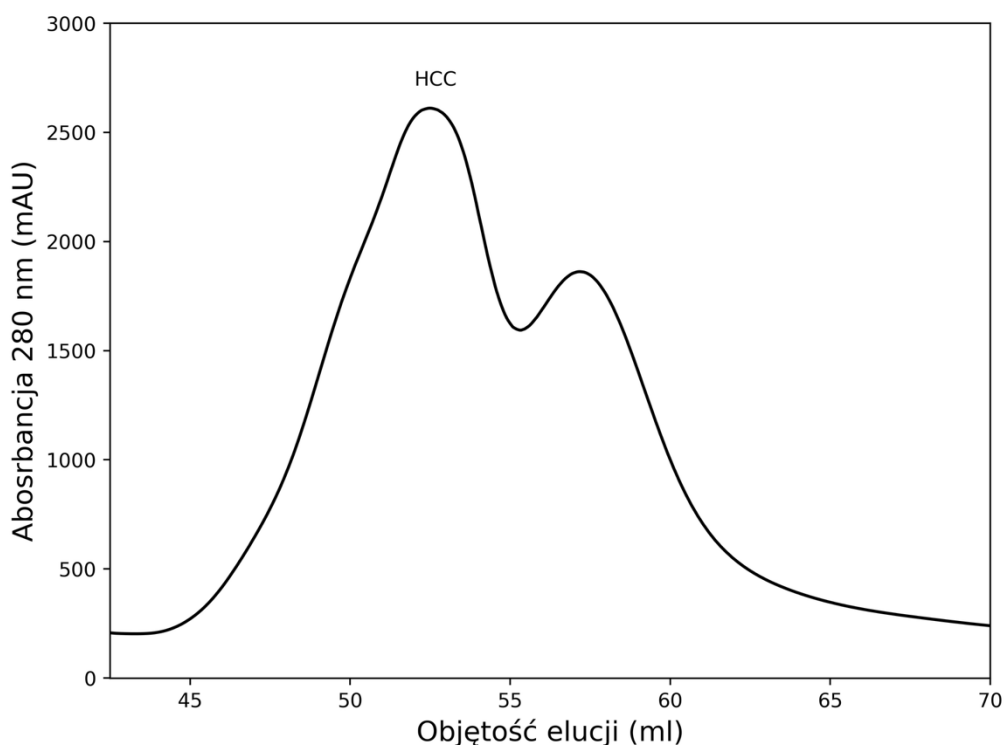
W toku pracy przeprowadzono również szereg prób syntezy innych typów nanocząstek, w tym różnych form tlenku cynku oraz alternatywnych układów miedziowych z wykorzystaniem różnych metod syntezy [241–247]. Ze względu na niezadowalające parametry fizykochemiczne (m.in. brak jednorodności, niska stabilność zawiesiny lub trudności w redyspergowaniu) materiały te zostały wykluczone z dalszych etapów badań. Choć nie są szczegółowo omawiane w niniejszej rozprawie, ich analiza stanowiła istotny etap selekcji i potwierdziła zasadność ostatecznego wyboru.

Również nanocząstki Cu^0 otrzymane w ramach własnej syntezy, mimo korzystnych właściwości fizykochemicznych i potwierdzonej struktury metalicznej, nie zostały ostatecznie włączone do dalszych eksperymentów. Główną przeszkodą były trudności w jednoznacznym określeniu ich efektywnego stężenia w fazie wodnej. Problemy z ilościową analizą zawartości miedzi uniemożliwiały rzetelne i powtarzalne przygotowanie prób do kolejnych etapów badawczych. W związku z tym, pomimo satysfakcjonujących wyników syntezy i charakterystyki, uznano, że materiał nie spełnia warunków niezbędnych do dalszego zastosowania.

W rezultacie, do dalszych badań wybrano syntetyzowane samodzielnie nanocząstki CuO , które jako jedyne spełniały wszystkie kluczowe kryteria aplikacyjne. Cechowały się one dobrą dyspersyjnością w wodzie i roztworach buforowych, wąskim rozkładem wielkości oraz niewielkimi wymiarami, co było szczególnie istotne w kontekście planowanych badań nad interakcjami z białkiem HCC oraz eksperymentów z wykorzystaniem promieniowania synchrotronowego. Ich jednorodność morfologiczna i przewidywalne właściwości fizykochemiczne czyniły je najbardziej wiarygodnym i kontrolowalnym materiałem do dalszych analiz.

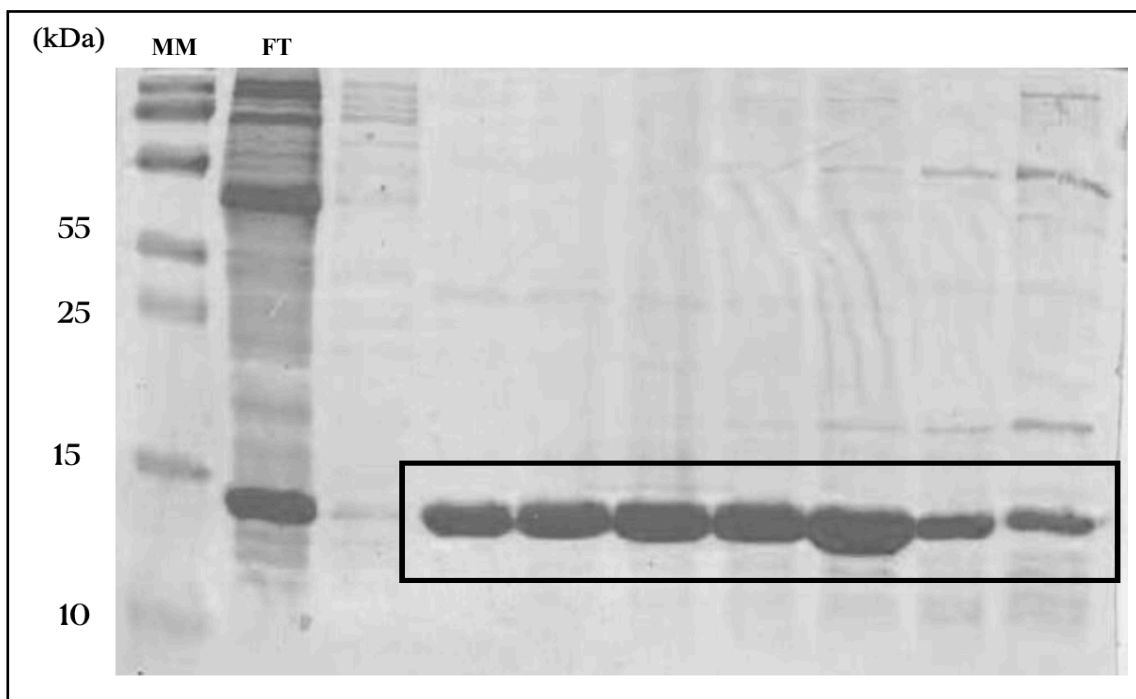
6.3 Charakterystyka ludzkiej cystatyny C

Po ekspresji białka w układzie bakteryjnym przeprowadzono dwuetapowy proces oczyszczania, obejmujący chromatografię jonowymienną oraz filtrację żelową. Celem było uzyskanie monomerycznej, dobrze rozpuszczalnej i czystej formy ludzkiej cystatyny C (HCC), niezbędnej do dalszych analiz z nanocząstkami. Jakość próbek białka HCC ma kluczowe znaczenie dla dalszych badań, dlatego przedstawiono uzyskane wyniki analiz. Chromatogram uzyskany metodą chromatografii jonowymiennej (rysunek 31) wykazał pojedynczy, dominujący pik elucyjny, odpowiadający frakcji zawierającej oczekiwane białko. Protokół został szczegółowo opisany w pracy [165].

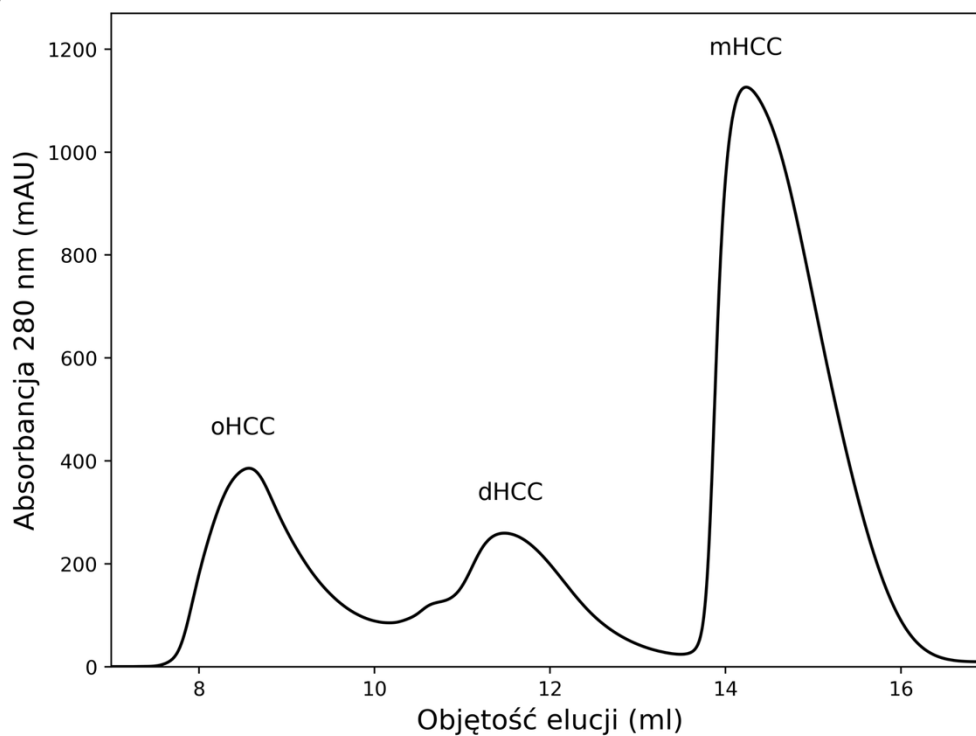


Rysunek 31. Przykładowy chromatogram ilustrujący efekty rozdziału ludzkiej cystatyny C na kolumnie powinowactwa jonowego (ang. ion exchange chromatography, IEX).

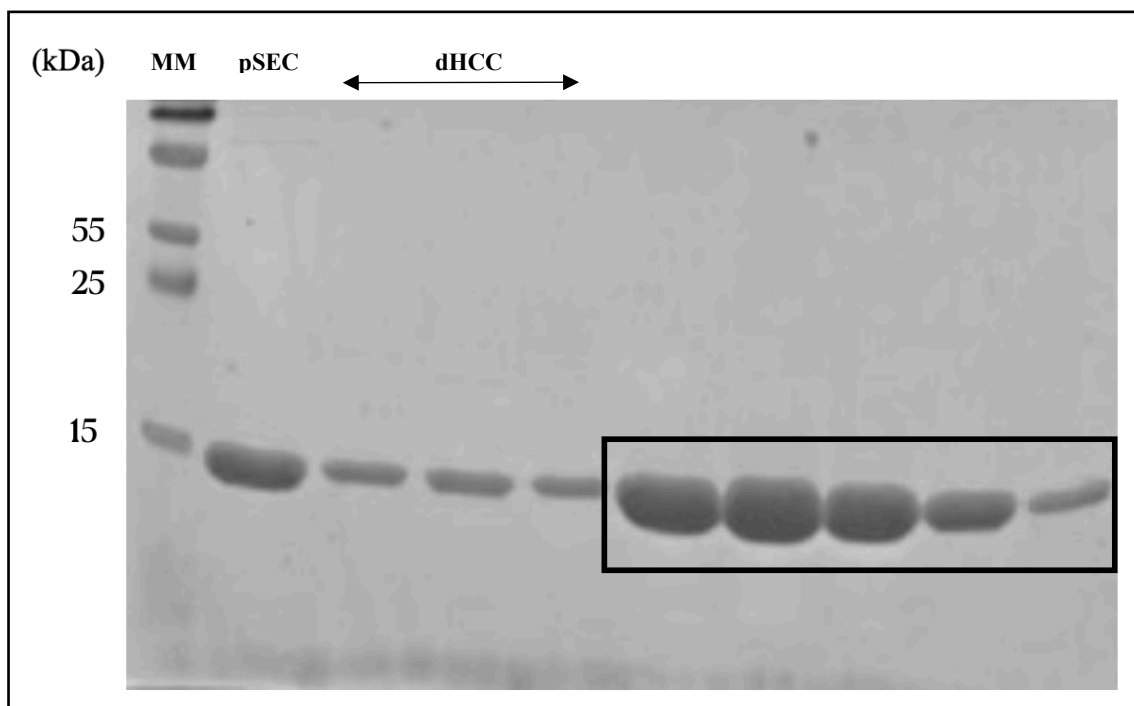
Elektroforeza SDS-PAGE próbki po chromatografii jonowymiennej (rysunek 32) potwierdziła obecność wyraźnego prążka o masie cząsteczkowej ~ 13 kDa, odpowiadającego masie cząsteczkowej ludzkiej cystatyny C. Widoczne były również słabsze sygnały w wyższym zakresie mas molekularnych, mogące odpowiadać śladowym ilościom zanieczyszczeń, co wskazywało na potrzebę dalszego oczyszczania.



Rysunek 32. Analiza SDS-PAGE oczyszczania białka HCC. W pierwszej linii widoczny jest marker masy cząsteczkowej (MM), w drugiej frakcja przepływowa (ang. flow through, FT), zawierająca białka, które nie związały się z kolumną IEX. W kolejnych liniach przedstawiono frakcje eluujące uzyskane podczas stopniowego zwiększania stężenia soli. W każdej z frakcji widoczny jest wyraźny prążek o masie ok. 13 kDa, odpowiadający białku HCC. Ramką zaznaczono frakcje wybrane do dalszego oczyszczania.



Rysunek 33. Przykładowy chromatogram oczyszczonego białka HCC uzyskany metodą filtracji żelowej. Widoczne są kolejno: pik odpowiadający wyższym oligomerom oHCC (~9 ml), pik dimeru dHCC (~12 ml) oraz pik monomeru mHCC (~15 ml).



Rysunek 34. Analiza SDS-PAGE przedstawiająca efekty końcowego etapu oczyszczania białka HCC. Pierwszy tor zawiera marker masy cząsteczkowej, drugi próbkę przed nałożeniem na kolumnę SEC (pSEC). Trzy kolejne tory przedstawiają frakcje odpowiadające dimerowi HCC (dHCC), natomiast dalsze - zaznaczone na obrazie - prezentują frakcje monomeru HCC uzyskane w trakcie elucji (mHCC).

Zastosowanie chromatografii żelowej (rysunek 33) pozwoliło na uzyskanie pojedynczego, symetrycznego pikę (przy objętości elucji 14-16 ml), odpowiadającego obecności monomerycznej frakcji HCC.

Wyniki elektroforezy po drugim etapie oczyszczania (rysunek 34) wykazały wyłącznie jeden, intensywny prążek w zakresie masy cząsteczkowej ~13 kDa, bez obecności innych prążków bocznych. Otrzymany preparat HCC można więc uznać za jednorodny pod względem masy cząsteczkowej i wysokiej czystości, co stanowiło niezbędny warunek do dalszych badań z wykorzystaniem nanocząstek i analizy oddziaływań białko-nanomateriał.

Po zakończeniu procesu oczyszczania białko zostało poddane liofilizacji, co umożliwiło jego długoterminowe przechowywanie bez utraty rozpuszczalności i jakości. Liofilizat (rysunek 35) dobrze rozpuszczał się w roztworach buforowych wykorzystywanych w dalszych etapach pracy, tworząc klarowne, jednorodne roztwory. Szacunkowa wydajność całego procesu wynosiła ok. 8 mg oczyszczonego białka z 1 litra hodowli bakteryjnej.



Rysunek 35. Liofilizat oczyszczonego białka HCC.

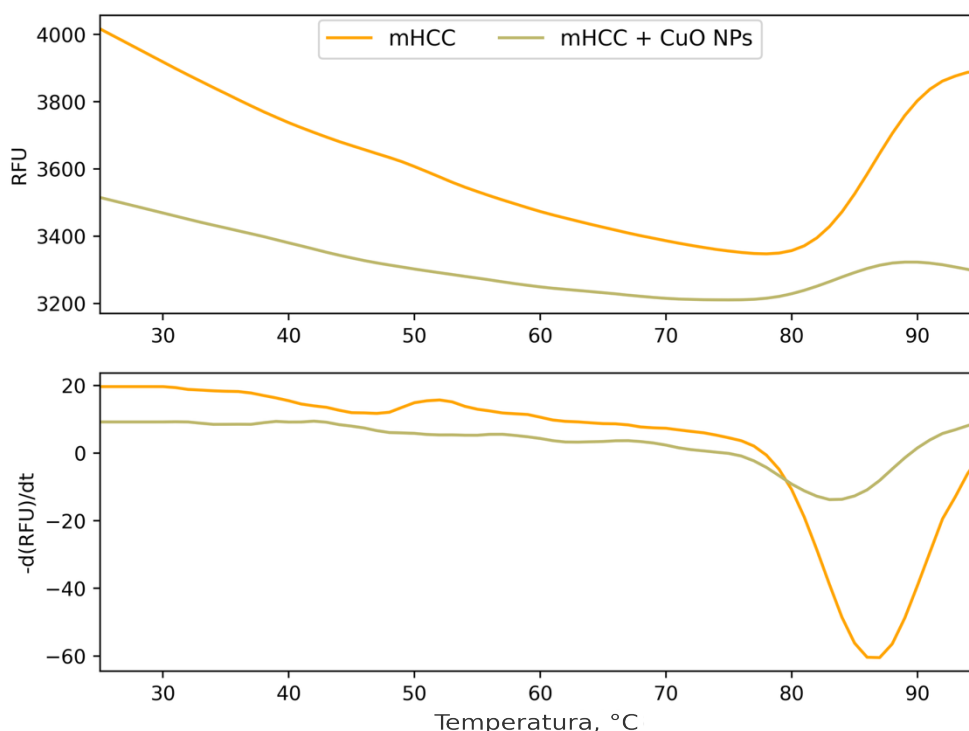
Proces ekspresji i oczyszczania białka był przeprowadzany zgodnie z wcześniej zoptymalizowanym protokołem [165], który zapewniał wysoką powtarzalność i jakość preparatu. Choć nie napotkano istotnych trudności technicznych, należy podkreślić, że procedura była bardzo czasochłonna i wymagała wielokrotnego powtarzania – zarówno na potrzeby kolejnych analiz (w tym wyjazdów synchrotronowych), jak i przygotowania materiału do badań prowadzonych równolegle. Łącznie wytworzono i oczyszczono ponad 200 mg białka HCC, co pozwoliło na realizację pełnego zakresu zaplanowanych eksperymentów.

6.4 Charakterystyka układów HCC z nanocząstkami CuO

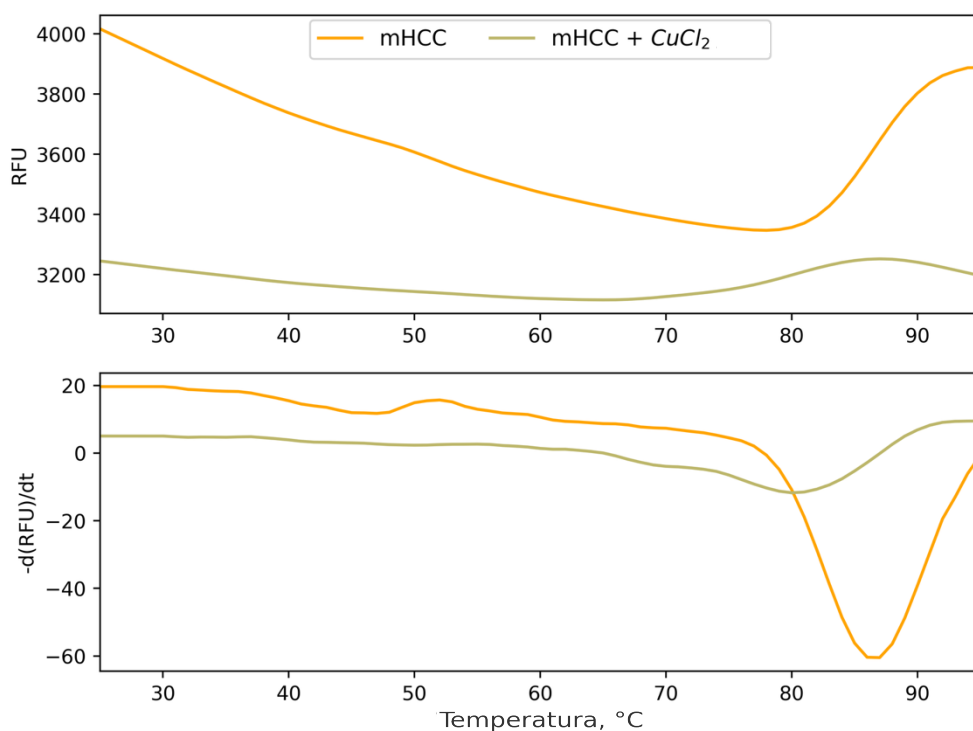
6.4.1 Stabilność układów HCC z Cu^{2+} oraz CuO NPs

W celu oceny jakościowej wpływu nanocząstek CuO oraz jonów Cu^{2+} na stabilność termiczną monomerycznej formy HCC (mHCC), przeprowadzono analizę zmian fluorescencji barwnika SYPRO Orange w funkcji temperatury. Na podstawie krzywych pierwszej pochodnej ($-\text{dRFU}/\text{dT}$) określono temperaturę topnienia białka (T_m), rozumianą jako temperatura odpowiadająca maksimum wzrostu sygnału fluorescencji, odpowiadająca minimum krzywej $-\text{dRFU}/\text{dT}$. Analizowane układy przygotowano przy stężeniu mHCC równym 0,4 mg/ml. Nanocząstki CuO dodano w stężeniu 12 $\mu\text{g}/\text{ml}$, natomiast stężenie jonów miedzi wynosiło 60 μM .

W przypadku zachowania próbki mHCC w funkcji temperatury zaobserwowano wyraźny pik topnienia w zakresie około 87–89°C. Dodatek nanocząstek CuO spowodował przesunięcie krzywej topnienia w stronę niższych temperatur ($T_m \sim 83\text{--}85^\circ\text{C}$), co wskazuje na istotne obniżenie stabilności termicznej białka (rysunek 36). Aby rozróżnić wpływ fizycznego oddziaływania powierzchni nanocząstek od potencjalnego efektu uwalniania jonów, do eksperymentu włączono również próbki zawierające CuCl_2 . W ich przypadku T_m obniżyła się jeszcze wyraźniej – do $\sim 81\text{--}82^\circ\text{C}$ – co może wskazywać, że jony Cu^{2+} wywierają silniejszy efekt destabilizujący niż same nanocząstki CuO (rysunek 37).



Rysunek 36. Zmiany intensywności fluorescencji barwnika SYPRO Orange (górny panel) oraz jej pierwsza pochodna ($-\text{dRFU}/\text{dT}$, dolny panel) w funkcji temperatury dla monomeru HCC (mHCC) oraz mHCC inkubowanego z nanocząstkami CuO.



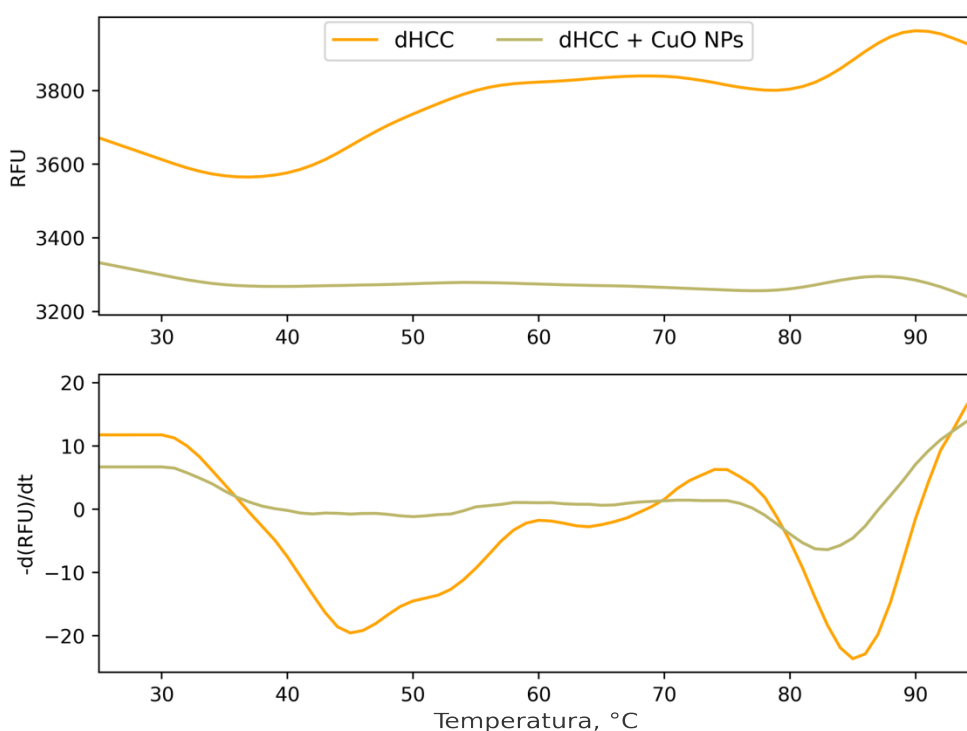
Rysunek 37. Zmiany intensywności fluorescencji barwnika SYPRO Orange (górny panel) oraz jej pierwsza pochodna ($-d(\text{RFU})/dT$, dolny panel) w funkcji temperatury dla monomeru HCC (mHCC) oraz roztworu mHCC inkubowanego z jonami Cu^{2+} .

Warto podkreślić, że bezpośrednie porównanie wpływu nanocząstek CuO i jonów CuCl_2 na stabilność mHCC jest utrudnione ze względu na różnice w efektywnym stężeniu dostępnych jonów Cu^{2+} . Dlatego obserwowane obniżenie T_m w obecności CuCl_2 należy interpretować jakościowo – jako potwierdzenie, że jony miedzi wykazują podobną tendencję destabilizującą jak nanocząstki CuO, choć mechanizm ich działania może być odmienny.

Zauważalny spadek intensywności fluorescencji w obu układach sugeruje dodatkowo, że obecność CuO NPs oraz jonów Cu^{2+} wpływa nie tylko na temperaturę topnienia białka, ale również na sposób jego rozfałdowywania. Nie można też wykluczyć, że interakcje miedzi z barwnikiem SYPRO Orange zmieniają jego właściwości fluorescencyjne, co również może wpływać na rejestrowany sygnał.

W dalszej części pracy przeanalizowano w podobny sposób również właściwości termiczne dimeru HCC (dHCC) pod wpływem nanocząstek CuO (rysunek 38) oraz jonów Cu^{2+} (rysunek 39). Obecność dimeru wynika z faktu, że podczas chromatografii żelowej (SEC) obok głównej frakcji monomeru wyodrębniono również wyraźnie oddzieloną frakcję o większej masie cząsteczkowej, odpowiadającą formie dimerowej HCC. Choć głównym celem pracy była analiza białka w formie monomerycznej, zdecydowano się także scharakteryzować dHCC, aby porównać jego stabilność termiczną z monomerem oraz ocenić, czy obecność nanocząstek CuO lub jonów Cu^{2+} wpływa na obie formy białka. Analizowane układy dimeryczne przygotowano przy stężeniu dHCC równym

0,4 mg/ml. Nanocząstki CuO dodano w stężeniu 6 $\mu\text{g/ml}$, natomiast stężenie jonów miedzi (Cu) wynosiło 30 μM . Krzywe topnienia uzyskane dla dimeru HCC (dHCC) wykazują wyraźnie dwufazowy przebieg, z pierwszym minimum w $\sim 44^\circ\text{C}$, a drugim przy $\sim 85\text{--}87^\circ\text{C}$. Może to odzwierciedlać rozpad dimeru na monomery (etap pierwszy), a następnie denaturację pojedynczych podjednostek białka (etap drugi). Zarówno dodatek nanocząstek CuO, jak i jonów Cu^{2+} wpływał na kształt tych krzywych. W obecności CuO NPs pierwszy pik uległ spłyceniu, a drugi przesunął się w kierunku niższych temperatur ($T_m \sim 83\text{--}84^\circ\text{C}$), co może wskazywać na obniżenie stabilności zarówno struktury dimeru, jak i jego monomerycznych składników. W przypadku jonów Cu^{2+} zaobserwowano przesunięcie drugiego pik do jeszcze niższego zakresu temperatur ($T_m \sim 81\text{--}83^\circ\text{C}$), co sugeruje silniejszy efekt destabilizujący.

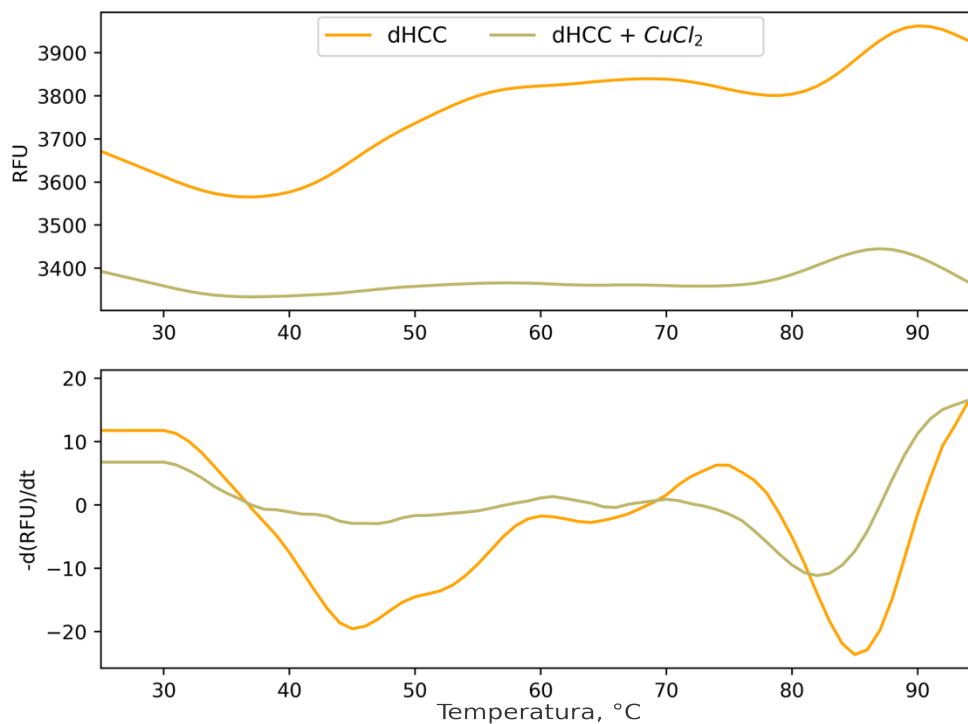


Rysunek 38. Zmiany fluorescencji barwnika SYPRO Orange (górny panel) oraz jej pierwsza pochodna ($-\text{dRFU}/\text{dT}$, dolny panel) w funkcji temperatury dla dimeru HCC (dHCC) oraz dHCC inkubowanego z nanocząstkami CuO.

Uzyskane wyniki testu termostabilności sugerują, że zarówno w przypadku monomeru, jak i dimeru HCC, obecność CuO NPs oraz jonów Cu^{2+} może prowadzić do zakłócenia stabilności białka – prawdopodobnie już na wczesnym etapie procesu denaturacji termicznej. Choć trudno jednoznacznie wskazać dominujący mechanizm, zauważalne różnice w temperaturach T_m mogą odzwierciedlać odmienne sposoby oddziaływania obu czynników.

Eksperymenty spektrofluorymetryczne z udziałem barwnika SYPRO z CuCl_2 miały charakter kontrolny i zostały przeprowadzone na etapie badań wstępnych, w celu

rozdzielenia potencjalnych mechanizmów działania nanocząstek. Choć jony Cu^{2+} wykazywały silniejszy efekt destabilizujący, zmiany obserwowane w obecności CuO NPs mogą świadczyć o dodatkowym, niezależnym mechanizmie – na przykład związanym z bezpośrednim kontaktem powierzchni nanocząstek z białkiem.



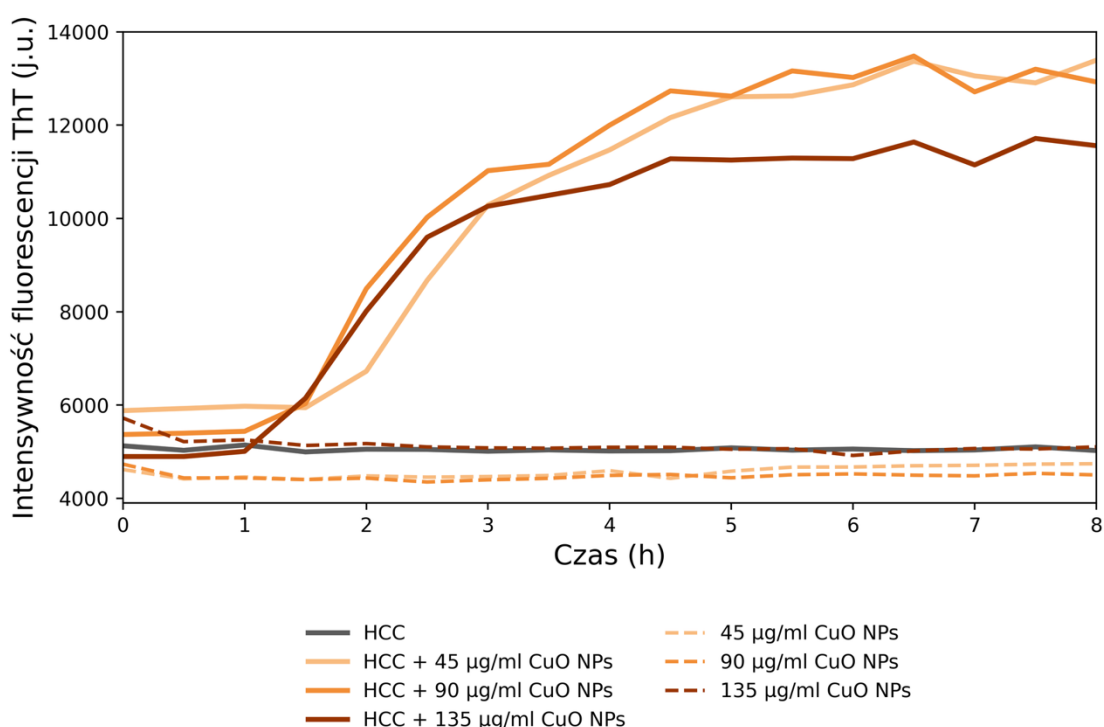
Rysunek 39. Zmiany fluorescencji barwnika SYPRO Orange (górny panel) oraz jej pierwsza pochodna ($-\text{dRFU}/\text{dT}$, dolny panel) w funkcji temperatury dla dimeru HCC (dHCC) oraz dHCC inkubowanego z CuCl_2 .

Porównanie efektów wywoływanych przez jony Cu^{2+} oraz nanocząstki CuO wskazuje na odmienny wpływ obu form miedzi na stabilność strukturalną HCC. Należy przy tym zauważyć, że nanocząstki CuO uznaje się za stosunkowo stabilne, a udział uwalnianych jonów Cu^{2+} jest prawdopodobnie niewielki. W związku z tym obserwowany efekt destabilizacji w próbkach zawierających wyłącznie nanocząstki CuO można traktować jako wynik ich własnego, niezależnego oddziaływania na strukturę HCC.

6.4.2 Wpływ nanocząstek CuO na agregację amyloidową ludzkiej cystatyny C w różnych warunkach pH

W dalszej części pracy podjęto próbę oceny wpływu CuO NPs na agregację HCC w warunkach zbliżonych do fizjologicznych (pH 6), sprzyjających występowaniu białka w postaci monomeru[165]. Zastosowano pH 6, ponieważ w tym buforze nanocząstki CuO tworzyły stabilną dyspersję i nie obserwowano zmian ich właściwości, co umożliwiło wiarygodne przeprowadzenie pomiarów. Pomiar prowadzono w buforze MES 100 mM z dodatkiem 200 mM NaCl, zawierającym 0,2 mM barwnika ThT oraz stałe stężenie białka HCC wynoszące 3 mg/ml. Reakcję monitorowano na czytniku płytek, rejestrując zmiany

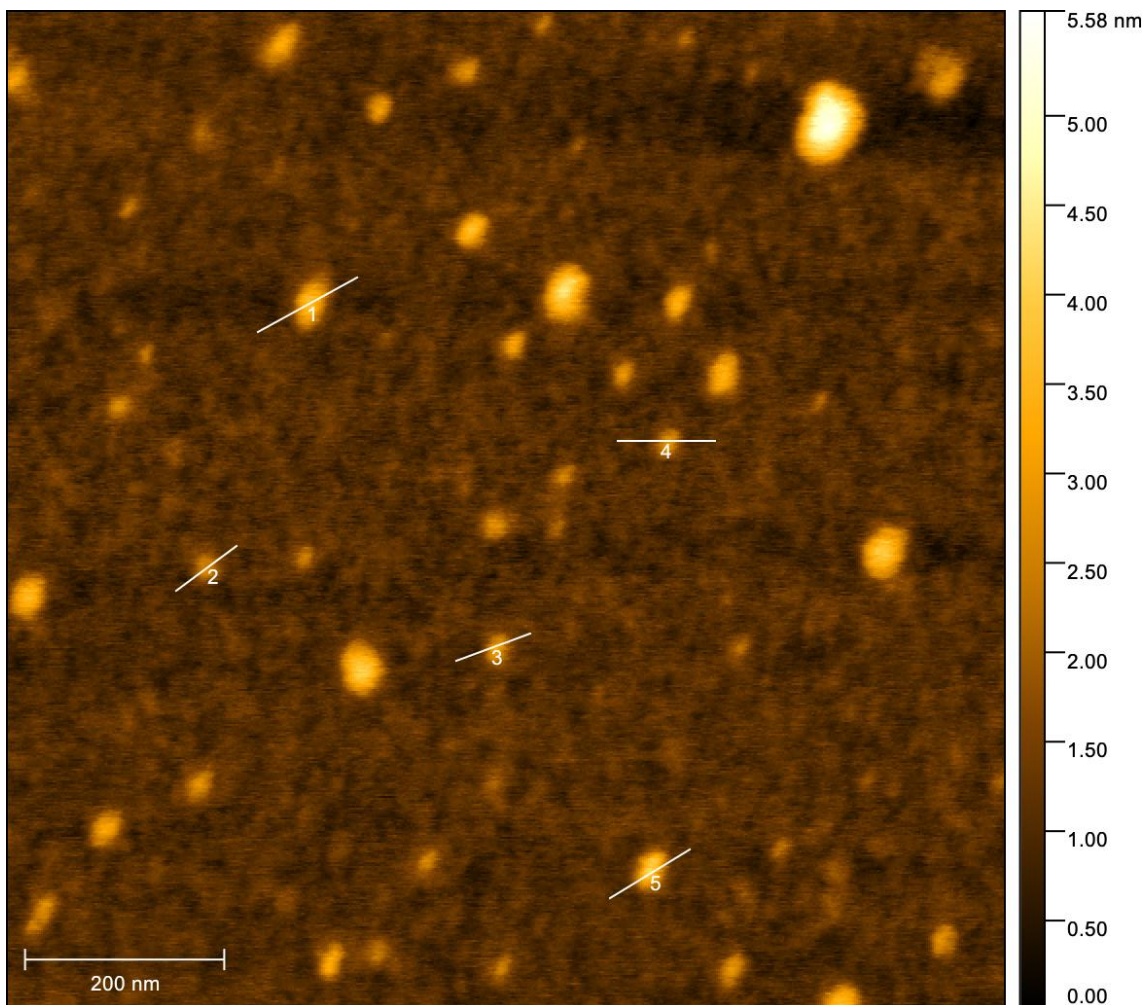
fluorescencji ThT, która pozwala wykrywać struktury o charakterze amyloidowym [248] (Rozdział 4.1) W przeprowadzonym eksperymencie monitorowano przebieg procesu oligomeryzacji HCC w obecności nanocząstek CuO o trzech różnych stężeniach (45, 90 i 135 $\mu\text{g/ml}$) oraz w próbie kontrolnej niezawierającej nanocząstek (rysunek 40). W próbce zawierającej jedynie HCC nie zaobserwowano istotnych zmian sygnału fluorescencji, co sugeruje brak tworzenia struktur amyloidowych w badanych warunkach. Natomiast w obecności nanocząstek CuO zaobserwowano wyraźny wzrost intensywności fluorescencji ThT, świadczący o indukcji procesu agregacji o charakterze amyloidowym. Zmiana ta pojawiała się już po około godzinie inkubacji w temperaturze 47°C, a największy przyrost sygnału odnotowano w ciągu kolejnych dwóch godzin.



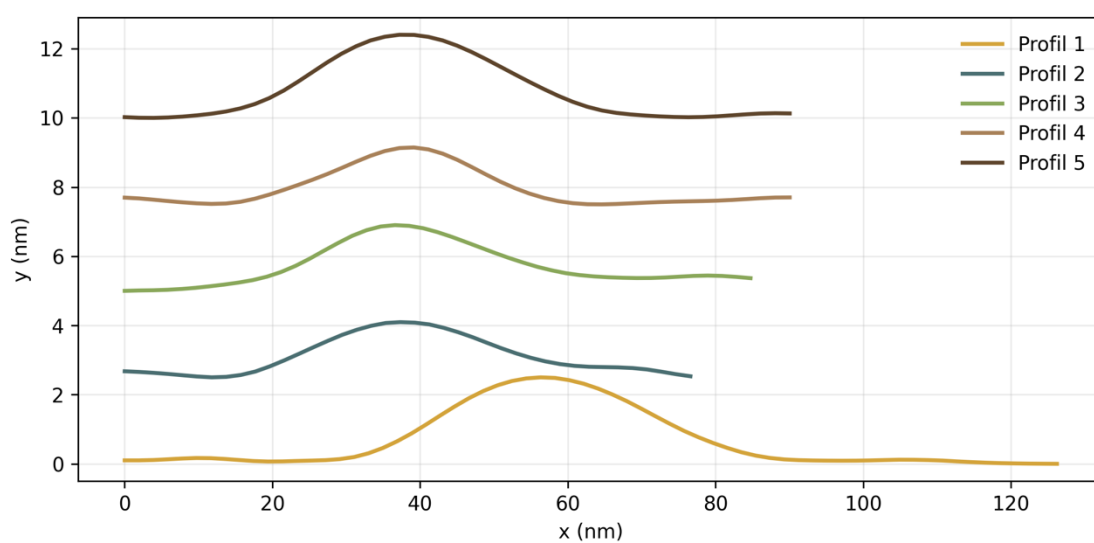
Rysunek 40. Zmiany intensywności fluorescencji tioflawiny T (ThT) podczas inkubacji białka HCC w obecności nanocząstek CuO (45, 90 i 135 $\mu\text{g/ml}$) oraz w próbce kontrolnej (bez CuO NPs). Pomiar przeprowadzono w pH 6.

Analizę mikrostruktury rozpoczęto od charakterystyki referencyjnych nanocząstek CuO, inkubowanych w warunkach identycznych jak w głównym eksperymencie, co pozwoliło na określenie ich typowego rozkładu oraz wymiarów (rysunek 41). Widoczne na obrazie pojedyncze obiekty osiągały wysokość rzędu ~ 5 nm.

Dodatkowo, w celu ilościowego potwierdzenia tych obserwacji, za pomocą AFM wyznaczono profile wysokości wybranych nanocząstek (rysunek 42). Uzyskane dane stanowiły istotny punkt odniesienia w analizie obrazów próbek zawierających HCC, umożliwiając jednoznaczną identyfikację nanocząstek na obrazach AFM oraz ocenę ich udziału w tworzeniu większych kompleksów białkowych.

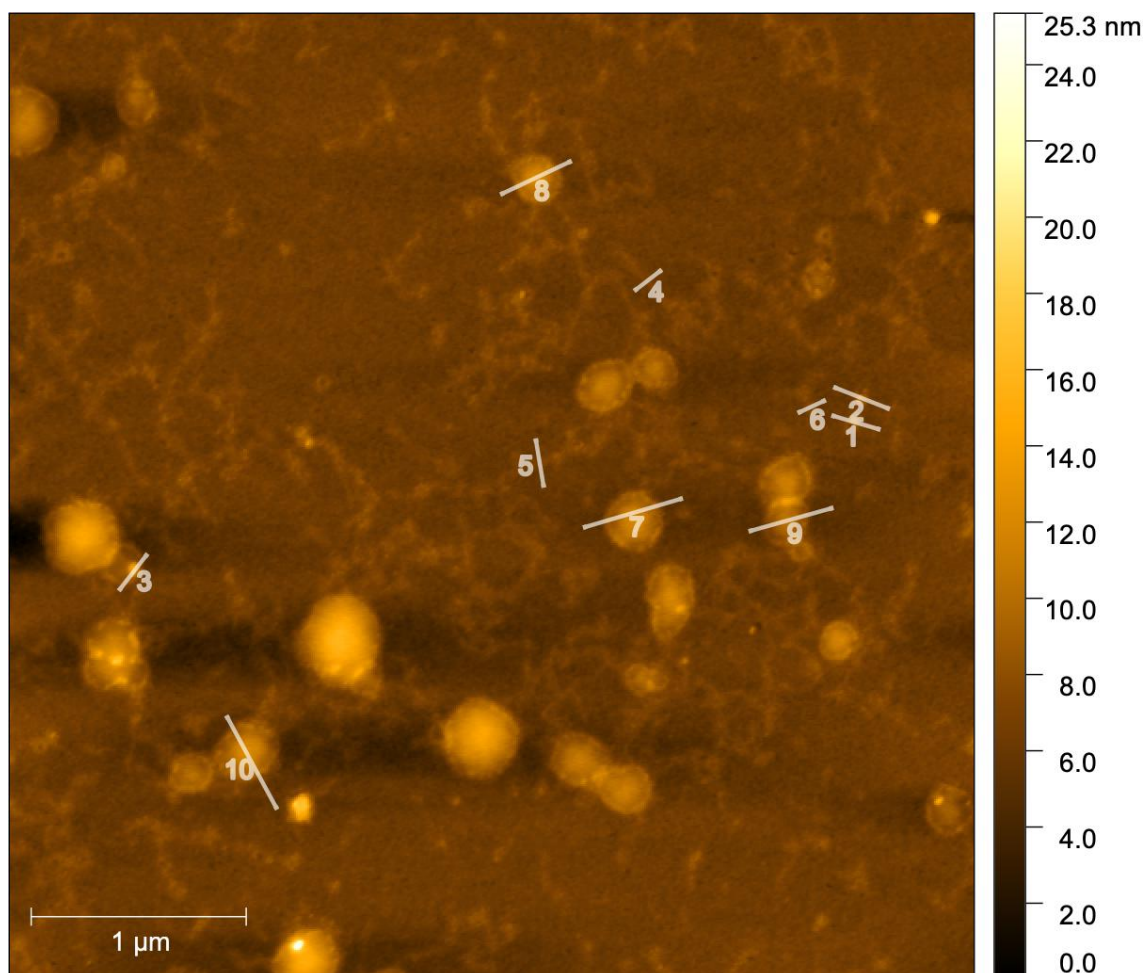


Rysunek 41. Przykładowy obraz topograficzny nanocząstek CuO inkubowanych w pH 6, uzyskany metodą AFM. Na rysunku zaznaczono profile wysokości przedstawione na rysunku 42.



Rysunek 42. Przekroje wysokości wykonane wzdłuż wybranych nanocząstek CuO w próbce kontrolnej (rysunek 41), przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności, obrazujące ich wymiary.

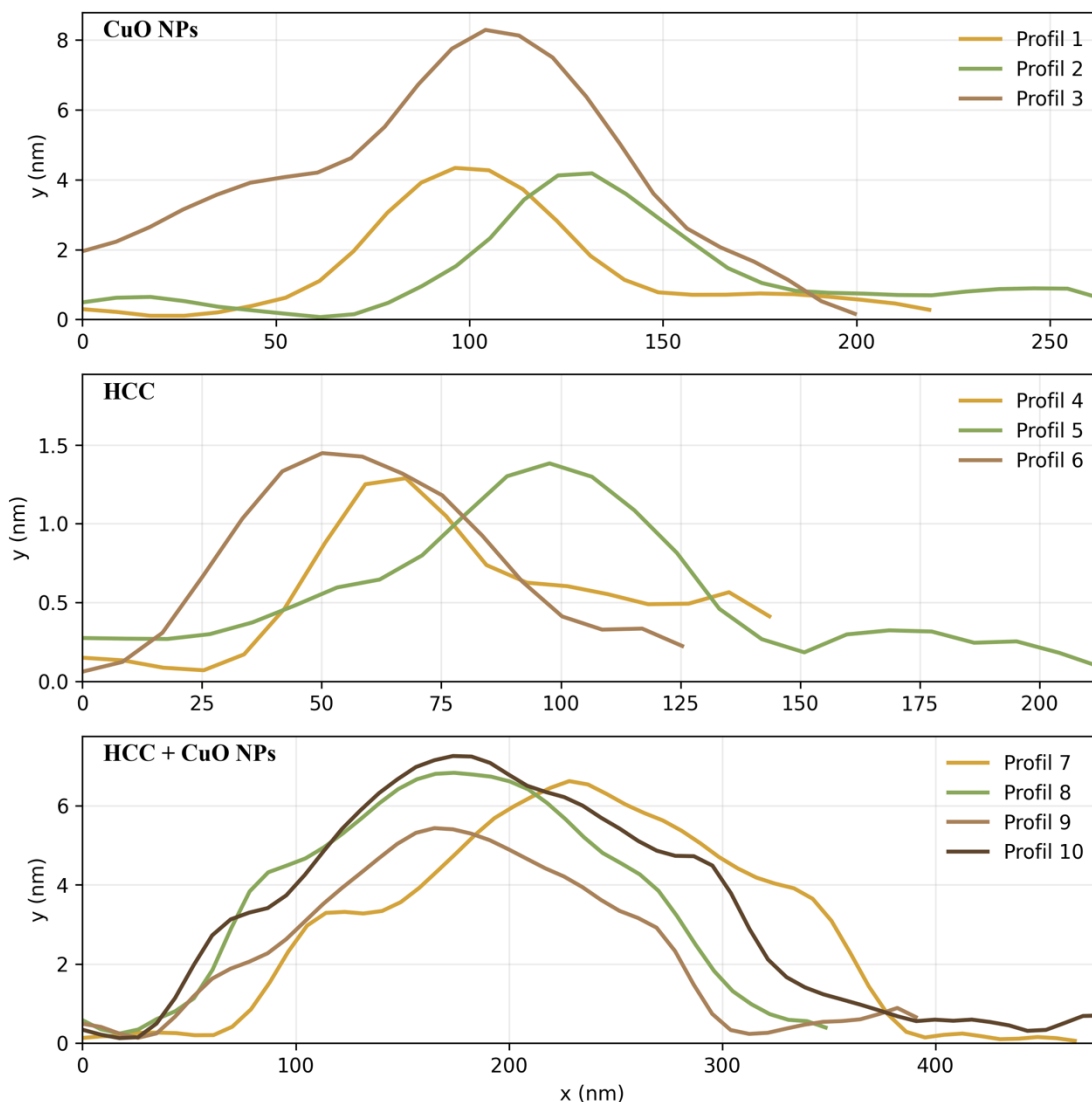
W celu dalszej charakterystyki powstałych agregatów, próbki po inkubacji z CuO NPs naniesiono na podłoże z miki i poddano analizie przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM). Uzyskane obrazy potwierdziły obecność zarówno nanocząstek, jak i struktur o charakterze włókien (fibryli) odpowiadających najprawdopodobniej formom amyloidowym HCC. Zarejestrowano także większe skupiska nanocząstek pokryte warstwą zagregowanego białka, z powierzchni których wychodziły fibryle osiągające długość do kilkuset nanometrów.



Rysunek 43. Obraz topografii próbki HCC inkubowanej z nanocząstkami CuO, uzyskany za pomocą mikroskopii sił atomowych (AFM). Na obrazie zaznaczono profile wysokości zaprezentowane na rysunku 44.

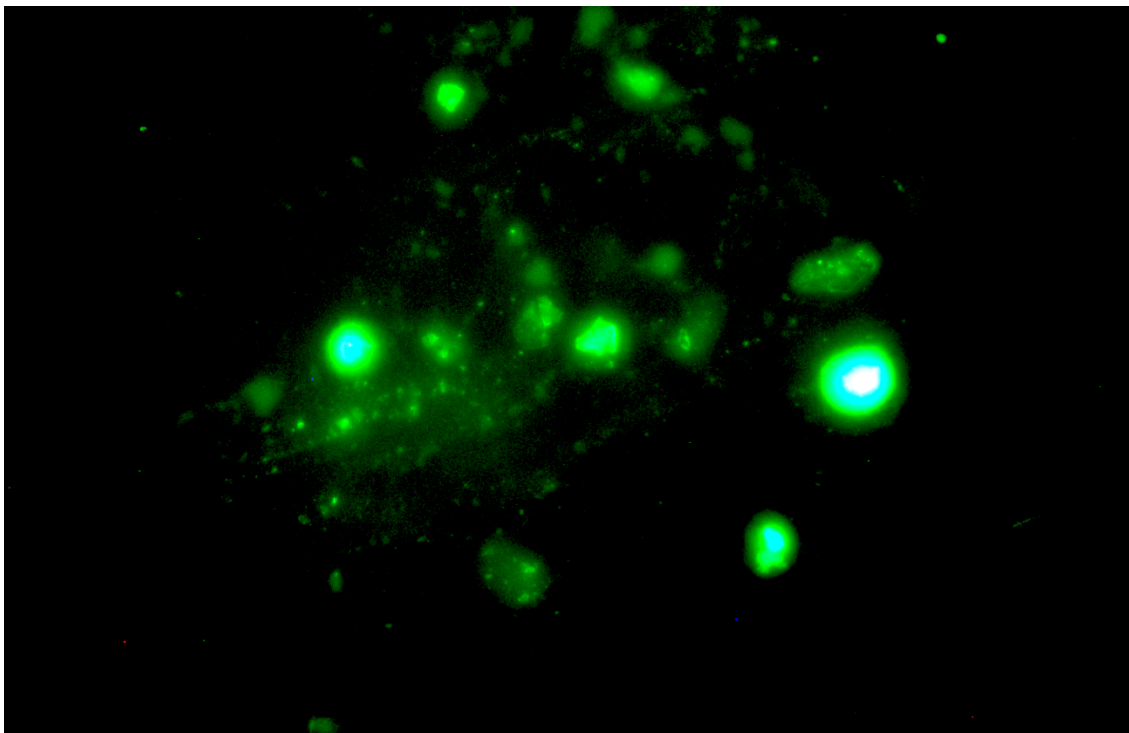
Na obrazie AFM (rysunek 43) zaznaczono profile odpowiadające nanocząstkom CuO, agregatom fibrylarnym HCC oraz aglomeratom nanocząstek pokrytych białkiem. Analiza profili wysokości (rysunek 44) ujawniła obecność struktur o różnych wymiarach. Formy o wysokości około 5 nm są zgodne z wcześniej określonym parametrem otrzymanego materiału CuO. Niższe elementy, rzędu 1–2 nm, mogą natomiast odpowiadać cienkim agregatom białkowym o cechach fibrylarnych. Z kolei struktury osiągające ~6–7 nm mogą reprezentować układy złożone, powstające w wyniku oddziaływania białka z CuO, w tym potencjalne aglomeraty lub struktury zbliżone do tzw. „korony białkowej”. Interpretację tę wspiera obserwowany w tej próbce wzrost fluorescencji ThT,

charakterystyczny dla form o strukturze β . Należy jednak podkreślić, że topografia AFM nie pozwala na jednoznaczne określenie składu analizowanych form, a uzyskane wyniki umożliwiają jedynie sformułowanie najbardziej prawdopodobnej interpretacji danych morfologicznych.



Rysunek 44. Profile wysokości wykonane wzdłuż wybranych linii pomiarowych (1–10), pokazujące różnice w wymiarach struktur: samych nanocząstek CuO (panel górny), agregatów białka HCC (panel środkowy) oraz kompleksów HCC+CuO NPs (panel dolny).

Na tej podstawie można przypuszczać, że nanocząstki CuO wpływają na inicjację procesu agregacji HCC w warunkach lekko kwaśnych (pH 6), sprzyjających utrzymywaniu się białka w formie monomerycznej [165]. Dodatkową weryfikację obecności agregatów przeprowadzono z użyciem mikroskopii fluorescencyjnej, która potwierdziła obecność skupisk HCC barwionych ThT, zgodnie z obserwacjami uzyskanymi w AFM (rysunek 45).

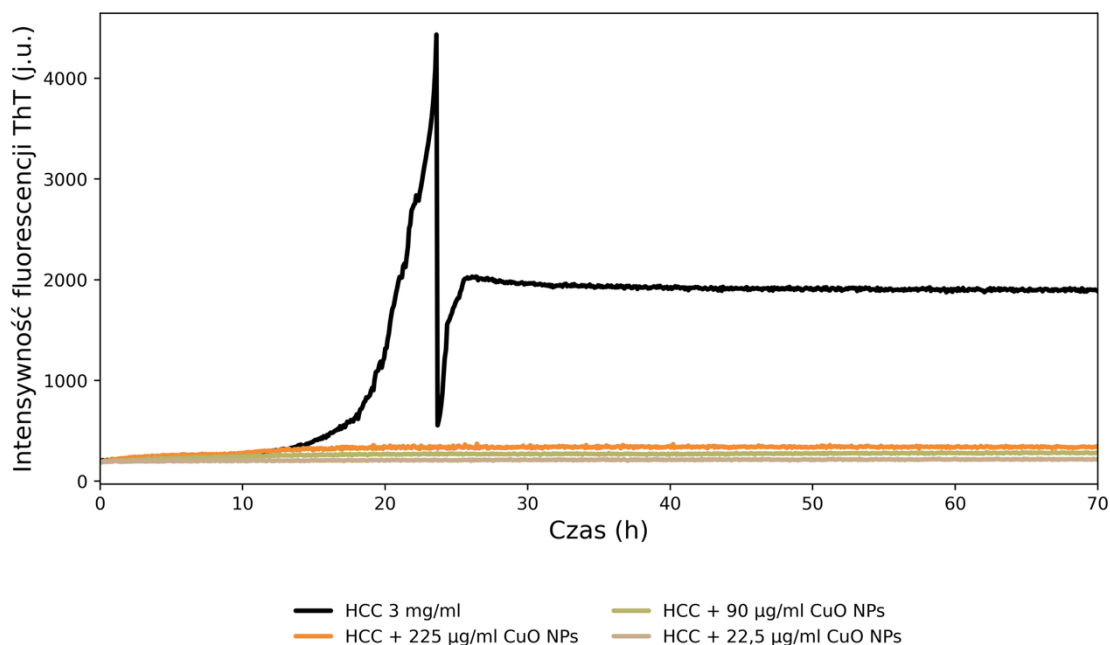


Rysunek 45. Obraz mikroskopii fluorescencyjnej próbki HCC inkubowanej z nanocząstkami CuO (pH 6) i barwionej tioflawiną T. Widoczne są skupiska agregatów białkowych o charakterze amyloidowym. Rozmiary agregatów określono ilościowo na podstawie pomiarów AFM (rysunki 43–44).

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ nanocząstek CuO na agregację HCC w środowisku kwaśnym (pH 4), typowo stosowanym w licznych eksperymentach oceniających właściwości amyloidogenne tego białka [169,170,249]. W warunkach kwaśnego pH (<5) cystatyna C jest głównie dimerem i wykazuje właściwości amyloidogenne w stopniu dużo większym niż w warunkach o wyższym pH. Eksperymenty przeprowadzono w buforze octanowym (50 mM octan sodu, 100 mM NaCl, pH 4), przy stężeniu białka 3 mg/ml. Inkubację prowadzono w temperaturze 47°C z intensywnym mieszaniem (700 rpm) przez 6 dni. Na wykresie (rysunek 46) przedstawiono przebieg przykładowych eksperymentów do 72 godzin, ponieważ w późniejszym czasie nie obserwowano dalszych zmian intensywności sygnału fluorescencji. W badaniach zastosowano trzy różne stężenia nanocząstek CuO (22,5 µg/ml, 90 µg/ml oraz 225 µg/ml). Postęp agregacji monitorowano na podstawie fluorescencji tioflawiny T (ThT), umożliwiającą ocenę obecności oraz dynamiki formowania struktur o charakterze amyloidowym.

Na podstawie krzywych zmian intensywności fluorescencji (rysunek 46) stwierdzono, że obecność nanocząstek CuO wyraźnie wpływała na przebieg agregacji – dla wszystkich analizowanych stężeń (22,5; 90 i 225 µg/ml) obserwowano istotne obniżenie sygnału ThT względem kontroli, co sugeruje hamowanie tworzenia struktur amyloidowych. W przypadku próbki kontrolnej zawierającej wyłącznie HCC

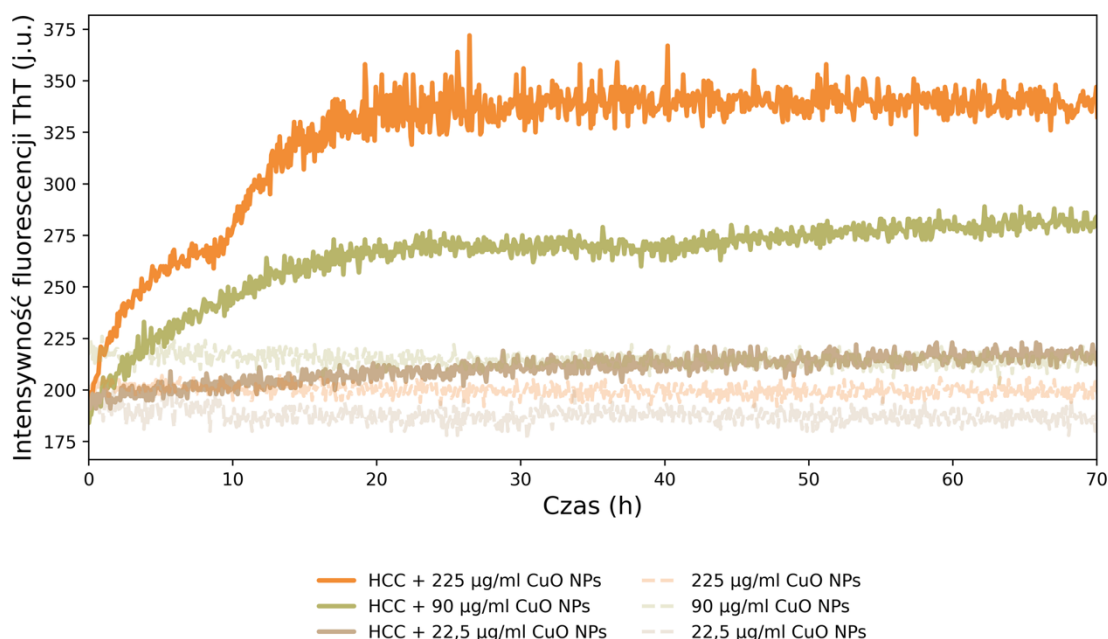
zaobserwowano gwałtowny wzrost intensywności sygnału ThT, osiągający maksimum w okolicach 25 godziny, a następnie stabilizujący się na plateau. Warto zaznaczyć, że obecność wyraźnego pików sygnału ThT w próbce HCC była powtarzalna i obserwowana w wielu niezależnych pomiarach, co sugeruje, że nie jest to przypadkowy artefakt pomiarowy. Prawdopodobnie jest to efekt gwałtownej agregacji i wytrącenia się nierozpuszczalnych agregatów białka.



Rysunek 46. Zmiana intensywności fluorescencji tioflawiny T (ThT) w czasie w trakcie pierwszych 72 godzin agregacji HCC (3 mg/ml) w środowisku kwaśnym (pH 4), oraz w obecności różnych stężeń nanocząstek CuO (22,5; 90 i 225 µg/ml).

Zaobserwowany efekt wygaszania fluorescencji ThT w obecności CuO NPs był zależny od ich stężenia – najniższe wartości intensywności odnotowano przy 22,5 µg/ml, natomiast dla wyższych stężeń (90 i 225 µg/ml) sygnał ThT stopniowo wzrastał (rysunek 47), pozostając jednak wyraźnie niższy niż w próbce kontrolnej. Choć redukcja sygnału ThT wskazuje na spowolnienie formowania struktur amyloidowych, nie można wykluczyć, że białko nadal ulega agregacji, jednak przybiera odmienną mikrostrukturę powstających agregatów.

Wyniki tych badań zostały zaprezentowane w pracy Rucińska i wsp.[250].

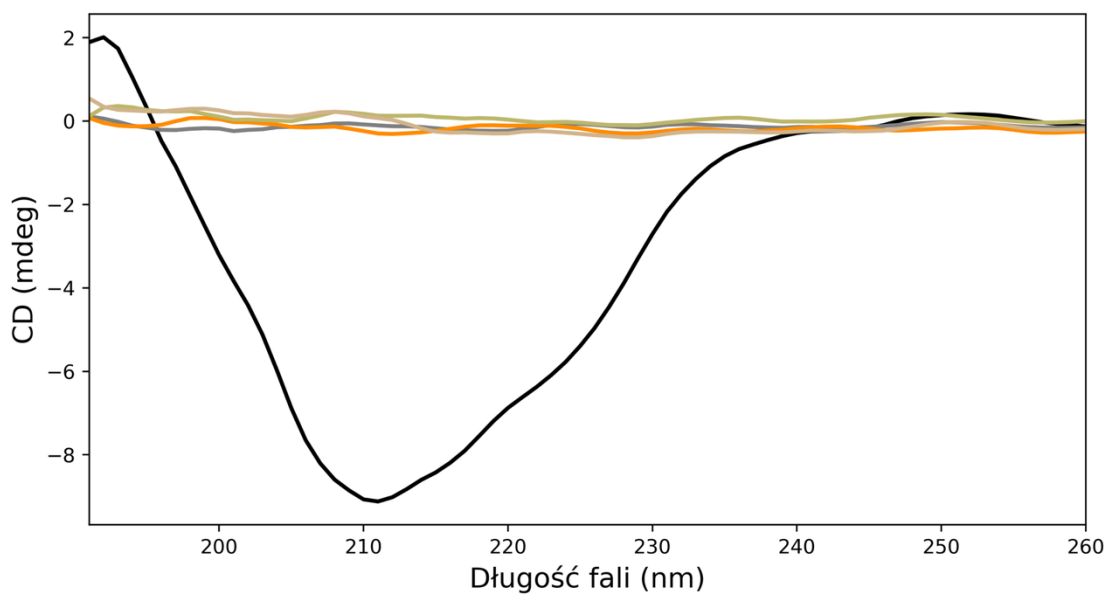


Rysunek 47. Zmiana intensywności fluorescencji tioflawiny T (ThT) w czasie w trakcie pierwszych 72 godzin agregacji HCC (3 mg/ml) w środowisku kwaśnym (pH 4), w obecności różnych stężeń nanocząstek CuO (22,5; 90 i 225 µg/ml).

Widma CD zarejestrowane po 6 dniach inkubacji próbek HCC, zarówno w warunkach kontrolnych, jak i w obecności nanocząstek CuO, wykazywały niemal całkowite spłaszczenie sygnału w zakresie dalekiego UV (190–260 nm) (rysunek 48). Zanikanie charakterystycznych minimów wskazuje na wysoki stopień agregacji białka, który uniemożliwia przeprowadzenie wiarygodnej analizy struktury drugorzędowej.

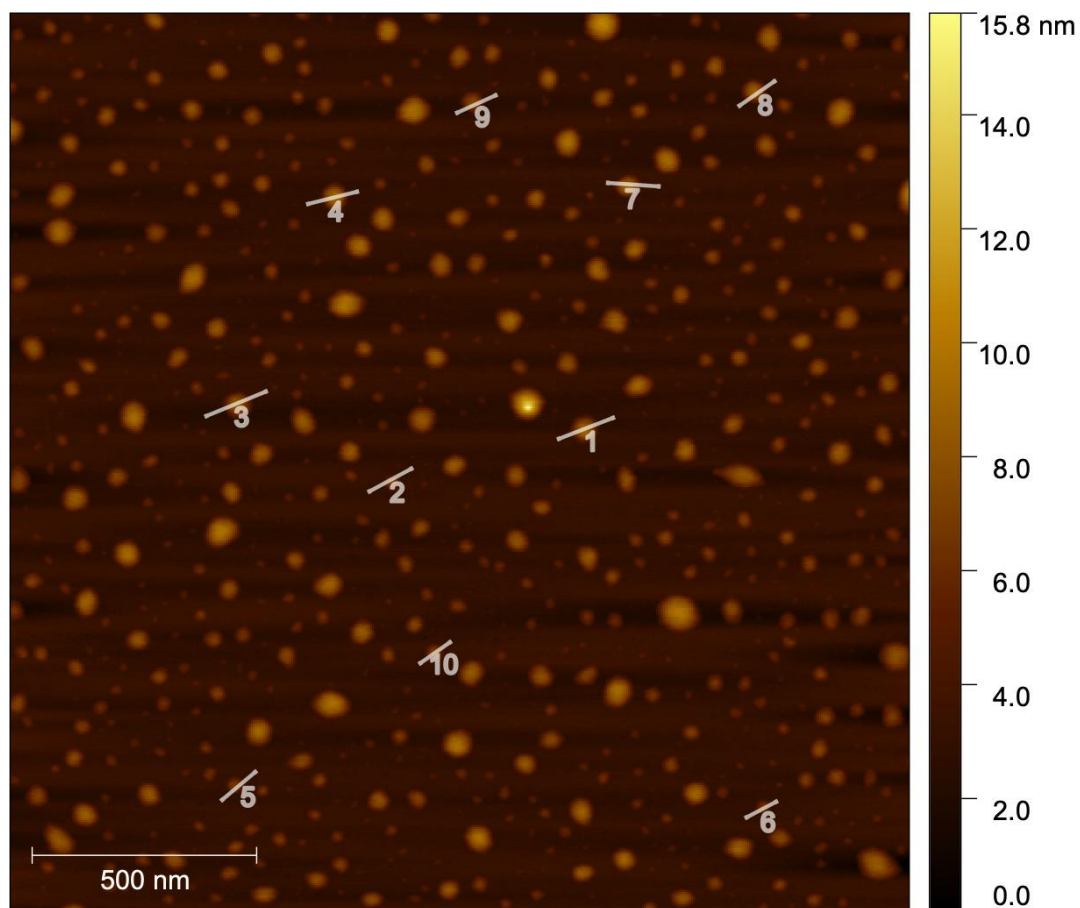
Warto podkreślić, że interpretacja widm CD w obecności nanocząstek obarczona jest istotnymi ograniczeniami metodycznymi. Nanocząstki CuO silnie rozpraszają światło w zakresie dalekiego nadfioletu, co prowadzi do spłaszczenia sygnału oraz obniżenia stosunku sygnału do szumu, niezależnie od rzeczywistego stanu konformacyjnego białka. Dodatkowo, próbki użyte do pomiarów CD nie mogły być bardziej skoncentrowane ze względu na ograniczoną dostępną objętość. Te same próbki były następnie analizowane metodą AFM, co wymuszało kompromis między jakością sygnału CD a wystarczającą ilością materiału do dalszych pomiarów.

Z tego powodu widma CD w analizowanych warunkach należy traktować jedynie jako metodę pomocniczą, potwierdzającą obecność zaawansowanej agregacji, natomiast nie pozwalają one na ilościową ocenę udziału struktur α -helikalnych czy β -karkowych. Kluczową metodą umożliwiającą jednoznaczną ocenę stopnia agregacji w tych próbkach było obrazowanie AFM, które nie podlega artefaktom wynikającym z rozpraszania światła przez nanocząstki. W związku z tym dalszą analizę ukierunkowano na szczegółową charakterystykę zmian topografii oraz wysokości struktur tworzonych przez HCC pod wpływem różnych stężeń CuO NPs, obejmującą analizę profili wysokości, profili fazowych oraz statystyczną ocenę uzyskanych parametrów.

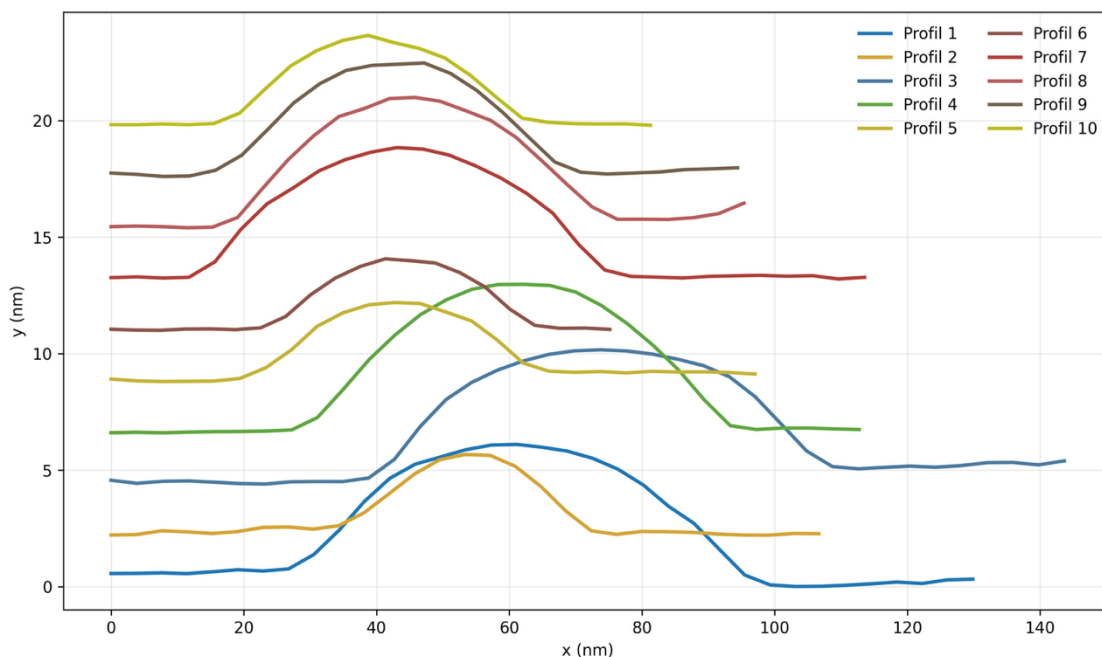


- HCC referencja 0h
- HCC
- HCC + 225 µg/ml CuO NPs
- HCC + 90 µg/ml CuO NPs
- HCC + 22,5 µg/ml CuO NPs

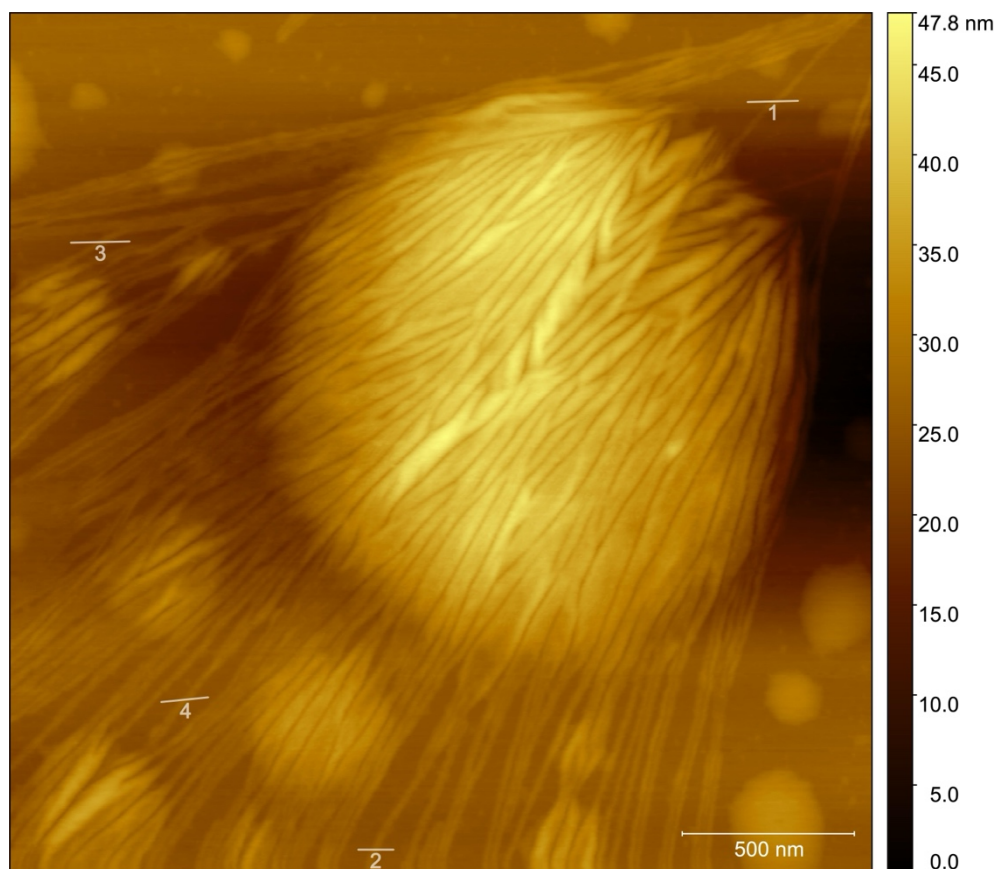
Rysunek 48. Widma dichroizmu kołowego (CD) zarejestrowane dla próbek HCC po 6 dniach inkubacji z nanocząstkami CuO o różnych stężeniach w zakresie dalekiego UV (190–260 nm), w porównaniu do próbki referencyjnej (czas 0 h).



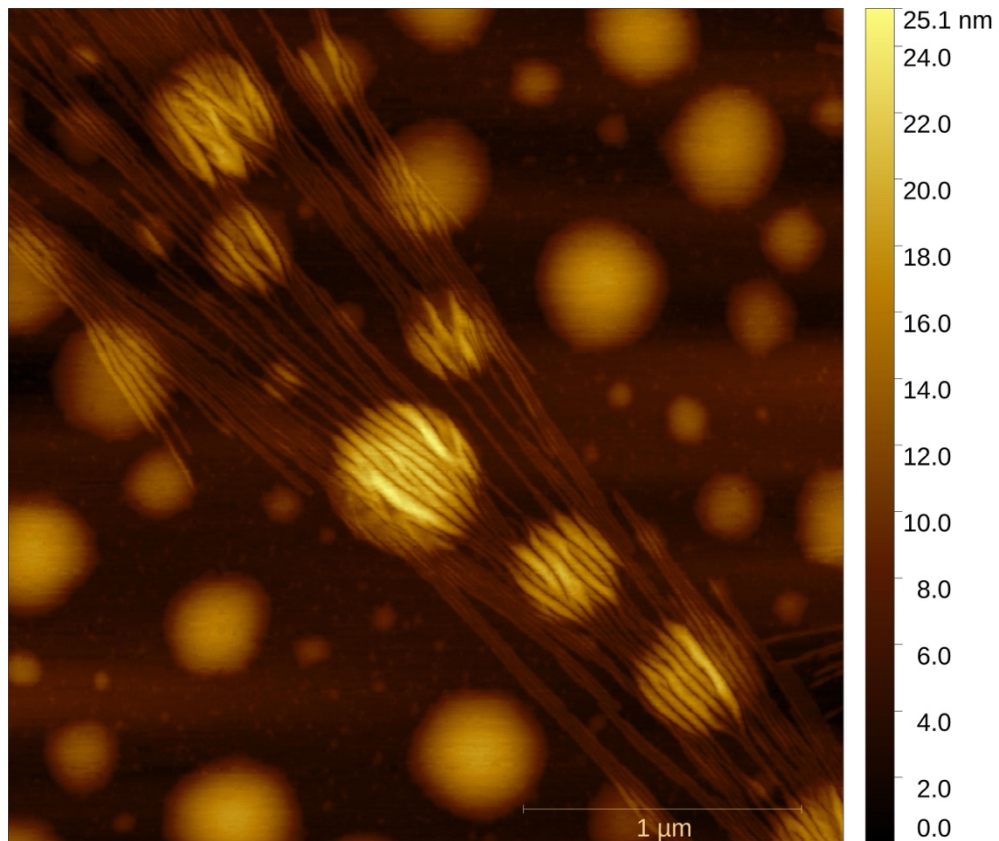
Rysunek 49. Obraz AFM próbki CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 50.



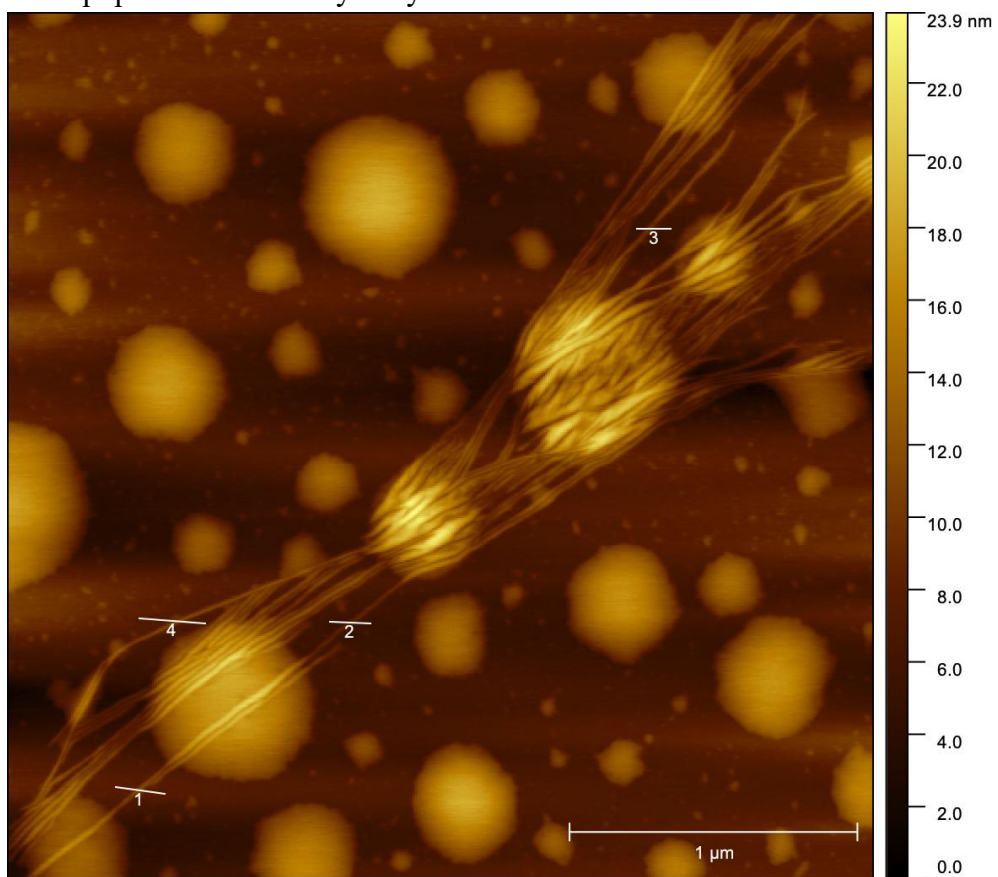
Rysunek 50. Zestawienie dziesięciu profili wysokości nanocząstek CuO wyznaczonych na podstawie pomiarów AFM. Każdy profil odpowiada pojedynczej nanocząstce zaznaczonej na obrazie topograficznym. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.



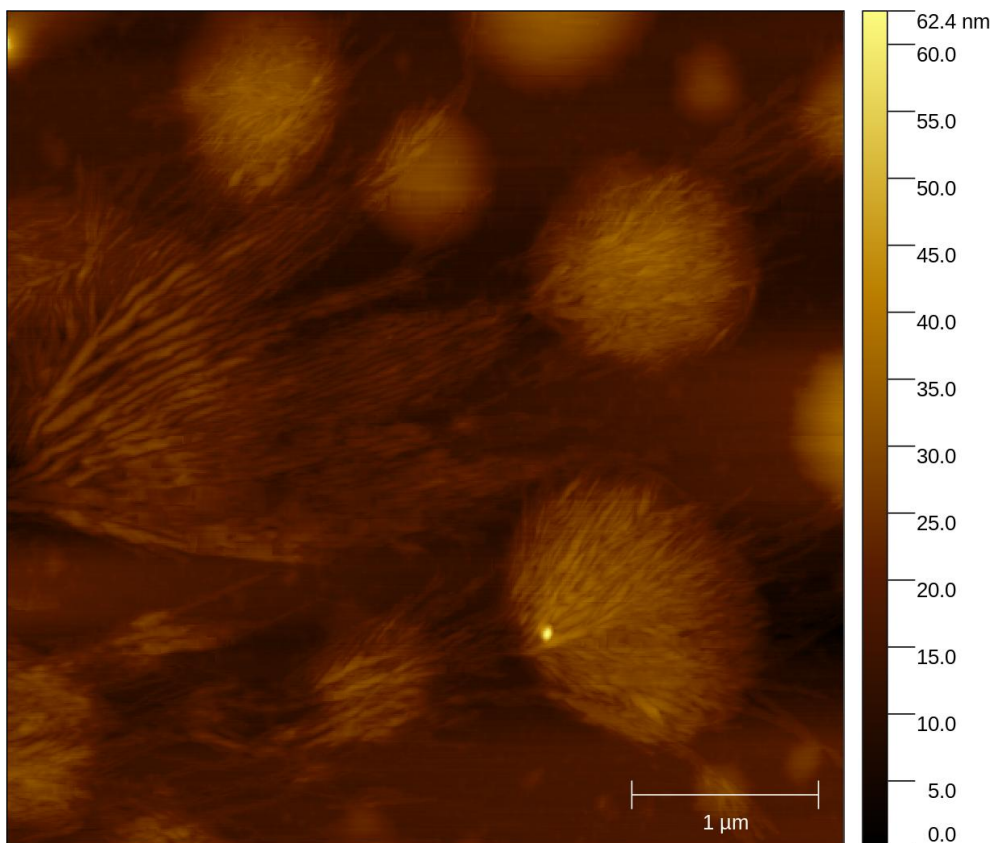
Rysunek 51. Obraz AFM próbki HCC po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie zaznaczono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



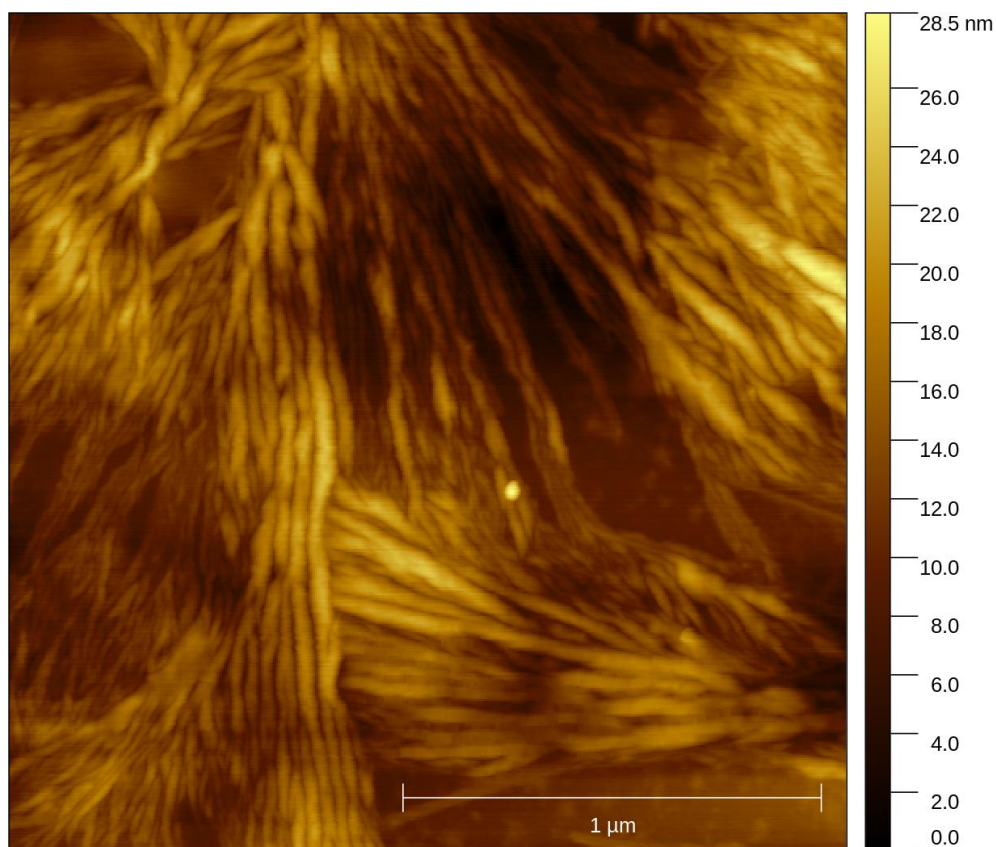
Rysunek 52. Obraz AFM próbki HCC po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Widoczne poprzeczne struktury fibrylarne.



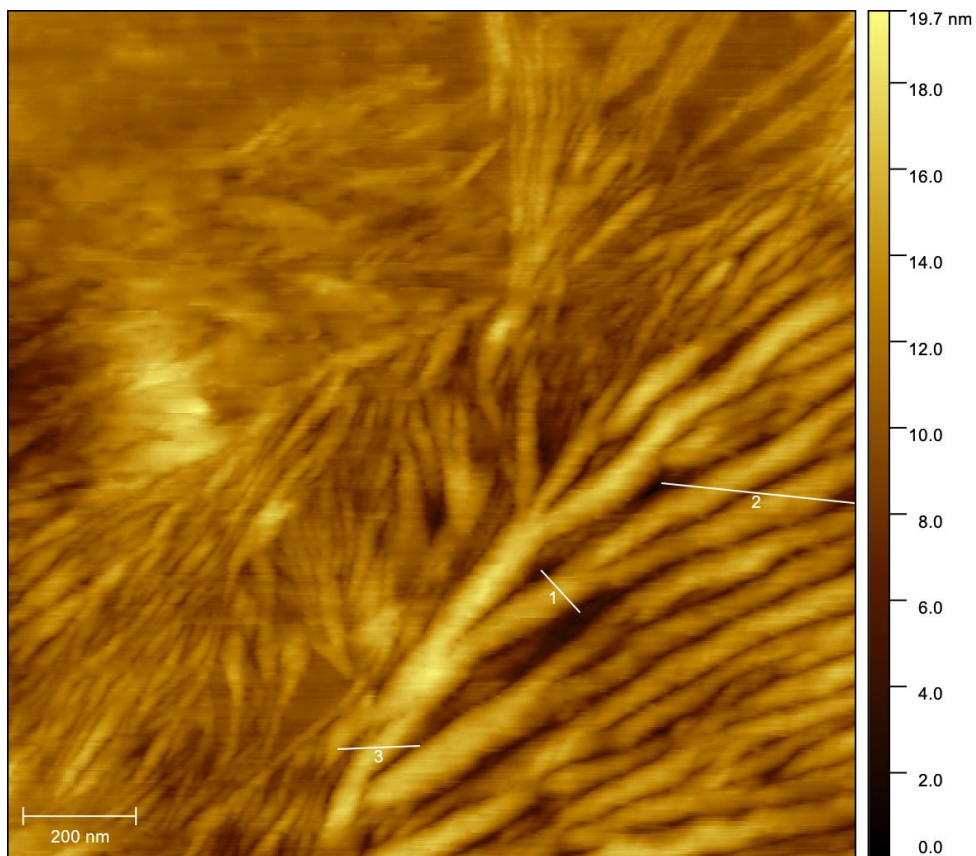
Rysunek 53. Obraz AFM próbki HCC po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



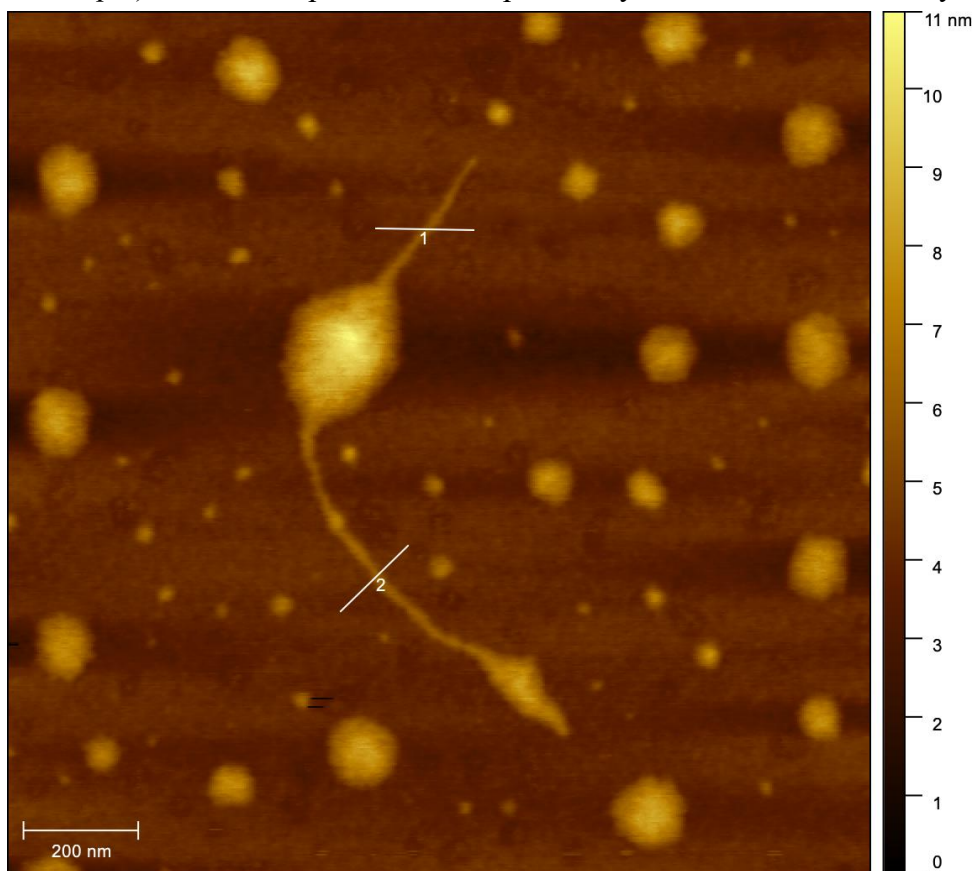
Rysunek 54. Obraz AFM próbki HCC z 225 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm).



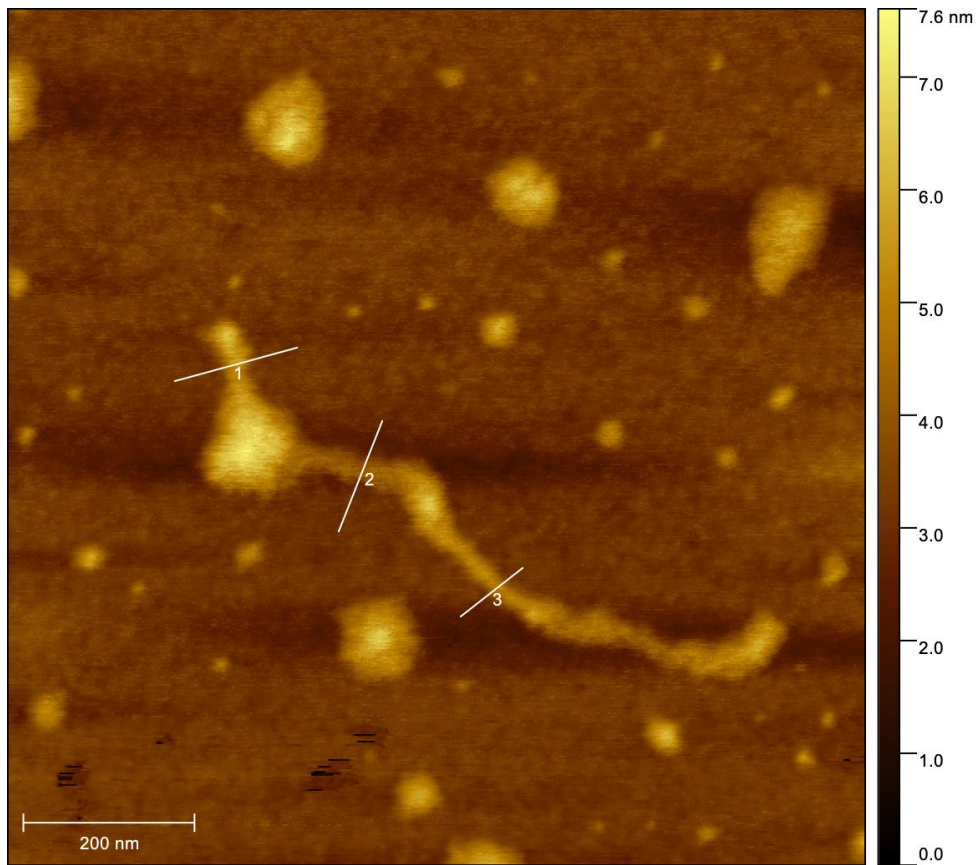
Rysunek 55. Obraz AFM próbki HCC z 225 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm).



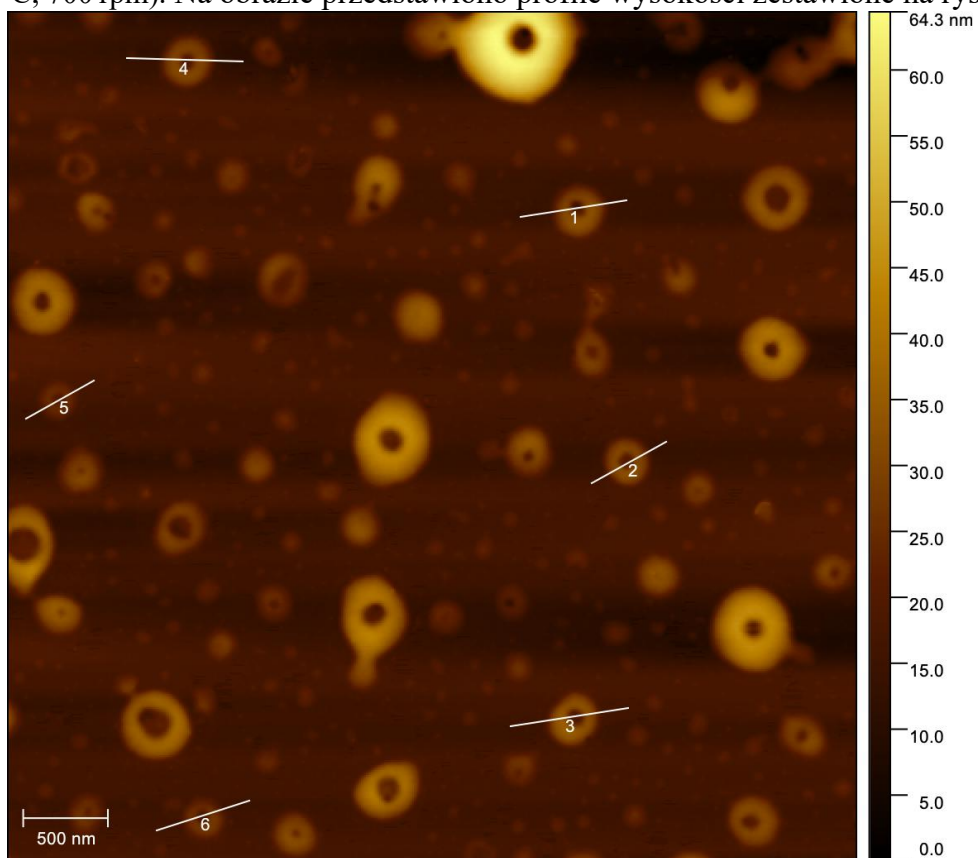
Rysunek 56. Obraz AFM próbki HCC z 225 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



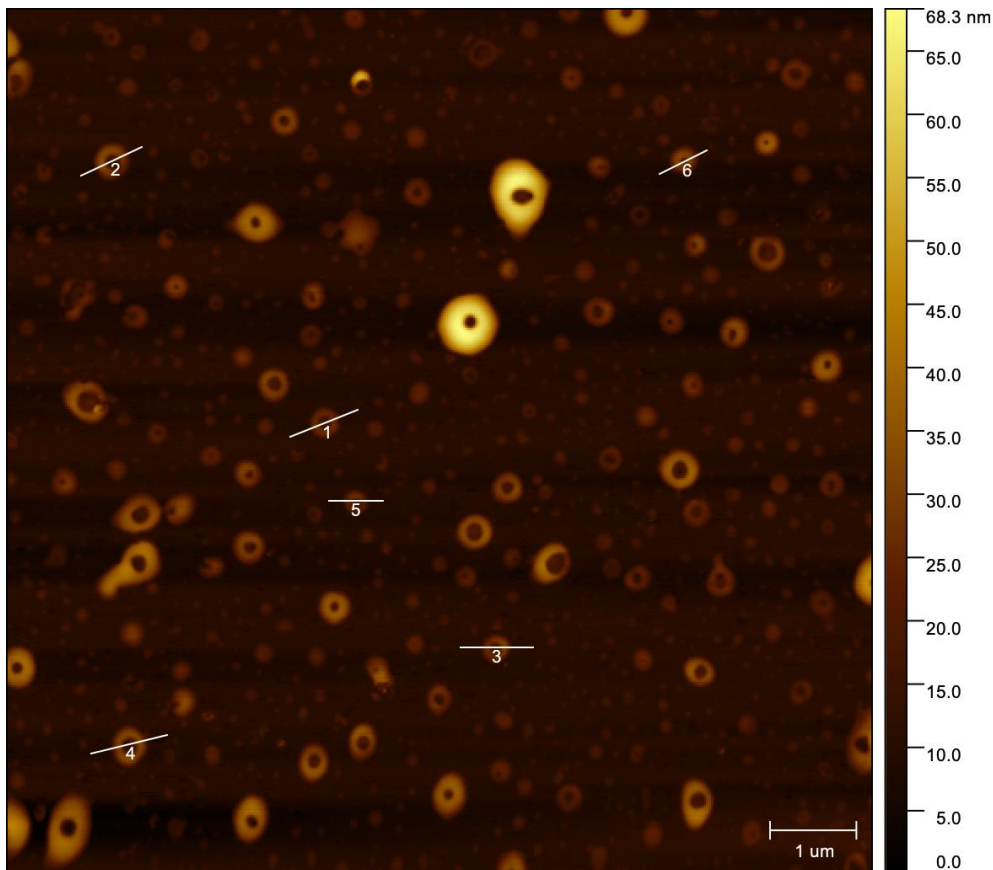
Rysunek 57. Obraz AFM próbki HCC z 90 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



Rysunek 58. Obraz AFM próbki HCC z 90 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



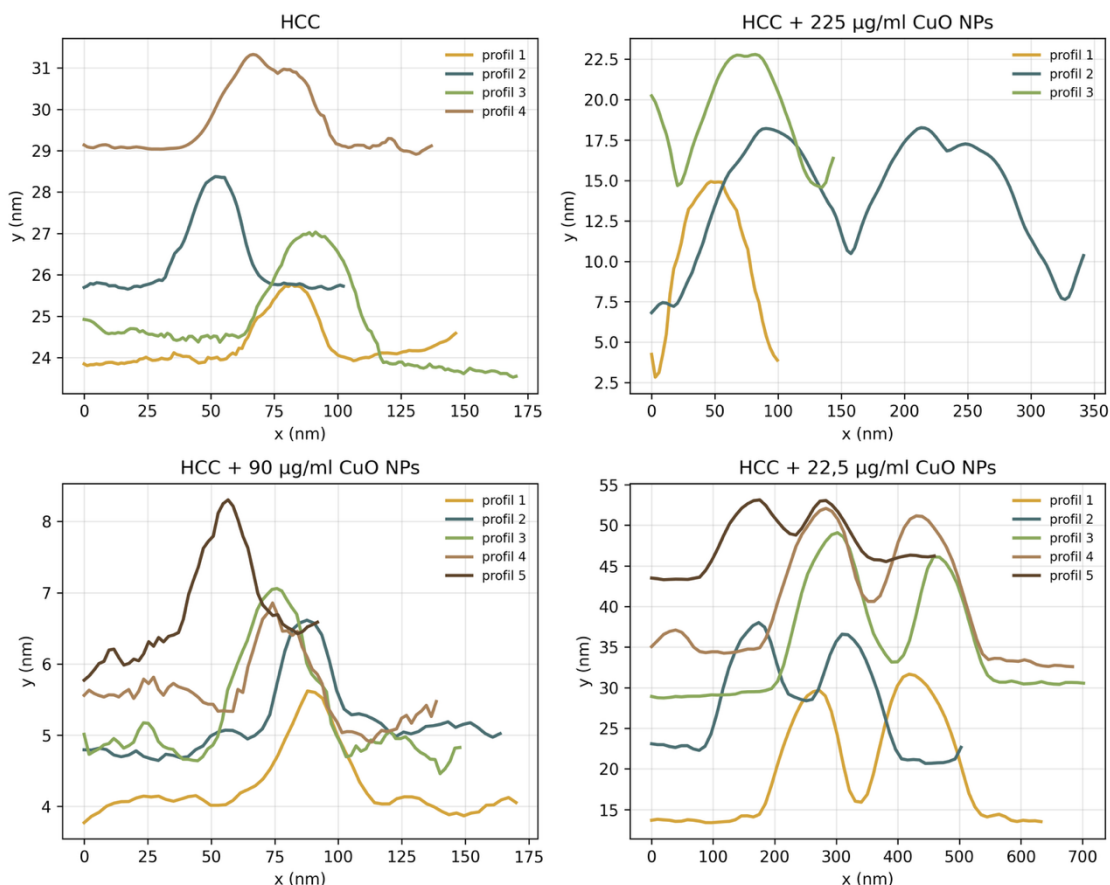
Rysunek 59. Obraz AFM próbki HCC z 22,5 µg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.



Rysunek 60. Obraz AFM próbki HCC z 22,5 μg/ml CuO NPs po 6 dniach inkubacji (47°C, 700 rpm). Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 61.

Na obrazie topograficznym AFM przedstawionym na rysunku 49 zaznaczono linie, wzdłuż których wyznaczono profile wysokości poszczególnych nanocząstek CuO. Odpowiadające im profile, zaprezentowane na rysunku 50, wskazują, że pojedyncze cząstki charakteryzują się rzeczywistą wysokością rzędu 3–6 nm. Charakterystyka nanocząstek była niezbędna do prawidłowej interpretacji dalszych wyników, dotyczących wpływu nanocząstek CuO na proces agregacji HCC. Obrazowanie AFM wykazało wyraźne różnice w strukturze formowanych agregatów. Dotychczas w literaturze nie przedstawiono systematycznej analizy morfologii samych fibryli HCC przy użyciu AFM, dlatego zdecydowałam przyjrzeć im się bardziej szczegółowo. W przypadku samego HCC (rysunki 51-53) obserwowano cienkie, rozproszone fibrylarne agregaty. W obecności 225 μg/ml CuO NPs (rysunki 54-56) powstawały natomiast grube, zbite struktury, sugerujące bardziej zaawansowany etap agregacji lub silniejsze oddziaływanie między białkiem a nanocząstkami. Próbką zawierającą 90 μg/ml CuO NPs (rysunki 57-58) wykazywała mniej jednoznaczne cechy - pojawiały się nieregularne agregaty, jednak bez wyraźnego włóknikowego charakteru. Najbardziej odmienne morfologie zaobserwowano przy najniższym stężeniu nanocząstek (22,5 μg/ml), gdzie dominowały owalne struktury o pustych centrach („pierścienie”), mogące sugerować alternatywne formy agregacji lub procesy nukleacyjne o odmiennym przebiegu (rysunki 59-60), które wcześniej opisywane były jako agregaty toroidalne, określane w literaturze anglojęzycznej jako struktury typu „donut”[170,251]. Zestawienie danych

spektroskopowych i obrazowania powierzchni wskazuje, że mimo zbliżonego udziału elementów struktury wtórnej, nanocząstki CuO mogą w sposób istotny wpływać na morfologię tworzących się agregatów HCC, co może mieć znaczenie dla ich właściwości biologicznych lub toksycznych.

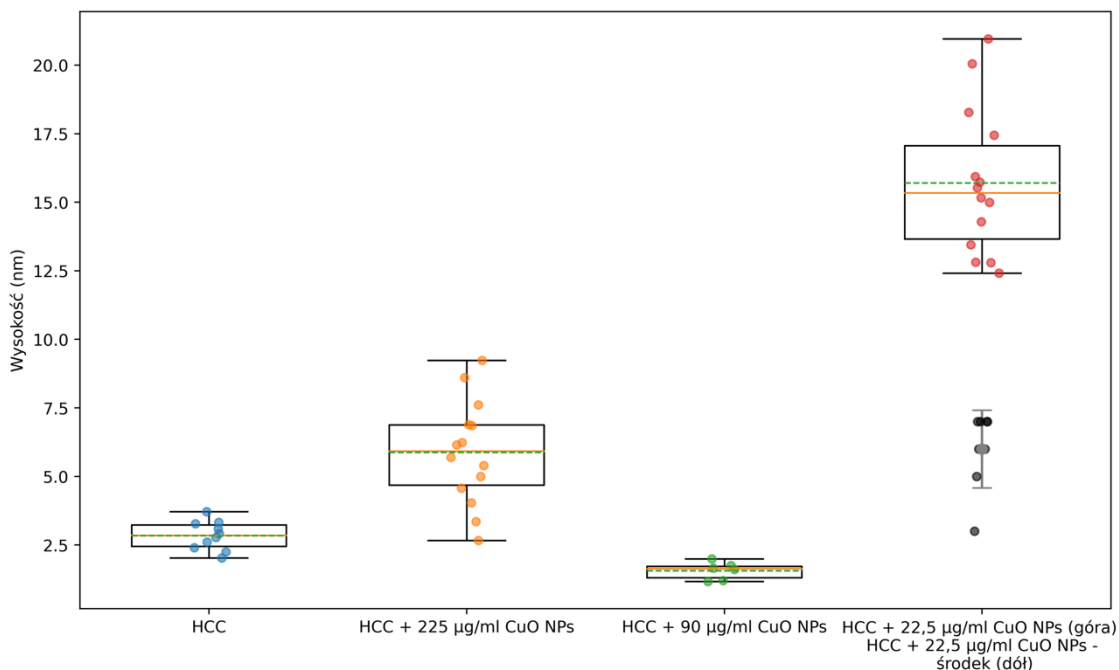


Rysunek 61. Wybrane profile wysokości na obrazach AFM próbek HCC oraz HCC inkubowanego z nanocząstkami CuO w różnych stężeniach. Górny lewy panel – HCC (kontrola), górny prawy – HCC + 225 µg/ml CuO NPs, dolny lewy – HCC + 90 µg/ml CuO NPs, dolny prawy – HCC + 22,5 µg/ml CuO NPs. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.

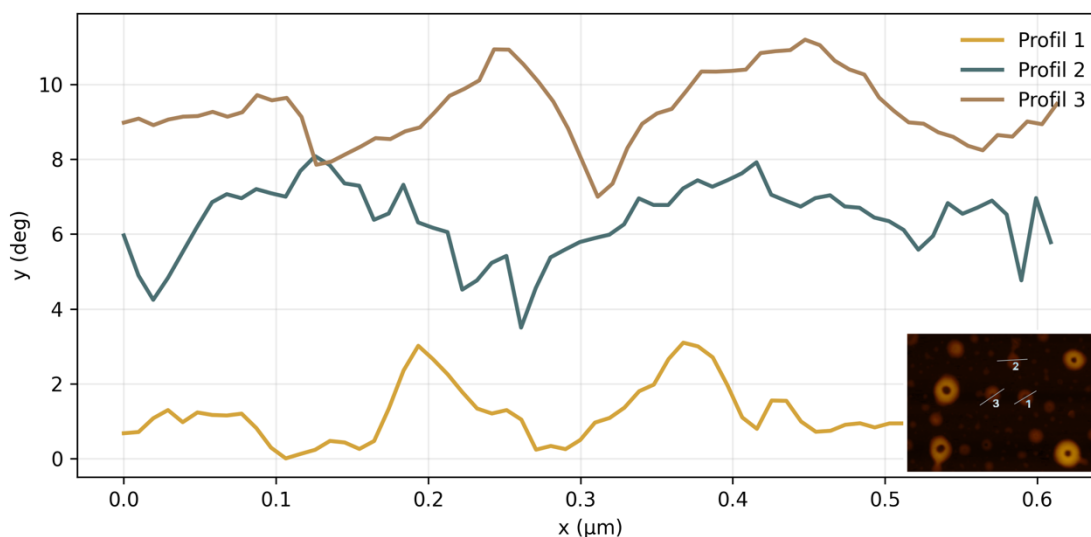
Podstawowym parametrem strukturalnym w AFM jest wysokość badanych obiektów (rysunek 61), dlatego przeprowadzono analizę statystyczną wysokości pojedynczych fibryli (rysunek 62), co potwierdziło różnice pomiędzy badanymi warunkami. Fibryle tworzone przez cystatynę C osiągały średnio $2,9 \pm 0,5$ nm ($n=10$), natomiast w obecności 225 µg/ml CuO NPs wysokość fibryli wzrastała do $5,7 \pm 1,8$ nm ($n = 14$). Pośrednie stężenie CuO (90 µg/ml) dawało fibryle o wysokości jedynie $1,6 \pm 0,3$ nm ($n = 6$). W próbkach inkubowanych z 22,5 µg/ml CuO NPs obserwowano struktury pierścieniowe o wyraźnie podwyższonym fragmencie obwodowym $16,0 \pm 2,6$ nm ($n = 14$) i obniżonym centrum $6,0 \pm 1,4$ nm ($n = 8$).

Analiza obrazów fazowych AFM (rysunek 63) wykazała wyraźny kontrast pomiędzy centralną częścią pierścieni a ich krawędzią, co wskazuje na różnice w właściwościach mechanicznych lub adhezyjnych. Choć pomiar fazowy nie pozwala na bezpośrednie określenie składu, obserwowane różnice sugerują obecność komponentów o odmiennej

sztywności – np. twardszego jądra (nanocząstki) i bardziej miękkiej otoczki białkowej. Obrazowanie AFM ujawniło niewątpliwie, że obecność nanocząstek CuO silnie moduluje proces agregacji cystatyny C w sposób zależny od stężenia. Wysokie stężenie (225 $\mu\text{g/ml}$) prowadzi do powstawania grubych fibryli, natomiast niskie (22,5 $\mu\text{g/ml}$) sprzyja formowaniu struktur pierścieniowych o zróżnicowanej wysokości i właściwościach mechanicznych. Pomimo tego, że metoda AFM nie pozwala na jednoznaczne określenie składu tych pierścieni, uzyskane profile wysokości i fazy wskazują na obecność co najmniej dwóch komponentów o odmiennych odpowiedziach fazowych, a więc różnych właściwościach nanomechanicznych.



Rysunek 62. Porównanie wysokości (AFM) pojedynczych struktur tworzonych przez HCC i HCC w obecności CuO NPs. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę (linia pomarańczowa), średnią (linia zieloną przerywaną), kwartyle oraz wartości indywidualne (punkty). Dla próbek HCC + 22,5 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs zaprezentowano oddzielnie wysokość brzegu pierścieni („góra”, czerwone punkty) oraz centrum („dół”, czarne punkty). Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) wykazała istotne różnice wysokości między badanymi warunkami ($F = 132,38$, $p < 0,0001$). Test post-hoc Tukeya potwierdził istotność wszystkich porównań z wyjątkiem zestawienia HCC vs. HCC + 90 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs ($p = 0,56$). Szczegółowe wyniki przedstawiono w tabeli 4.



Rysunek 63. Profil fazowy AFM wyznaczony wzdłuż zaznaczonej linii na obrazie próbki HCC inkubowanej z 22,5 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs. Wykres przedstawia zmianę kąta fazowego (y [deg]) w funkcji odległości (x [μm]) na przekroju pojedynczej struktury pierścieniowej, ukazując wyraźny kontrast pomiędzy centralną częścią, a krawędzią pierścienia. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.

Analiza statystyczna wysokości struktur obserwowanych na obrazach AFM wykazała, że warunki inkubacji istotnie wpływały na ich charakter. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) potwierdziła wyraźny efekt obecności i stężenia nanocząstek CuO ($F = 132,4$, $p < 0,0001$). Dalsza analiza post-hoc Tukey'a HSD wykazała istotne różnice pomiędzy wszystkimi badanymi grupami z wyjątkiem porównania HCC + 90 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs vs. HCC, dla którego nie stwierdzono istotnej różnicy (tabela 4).

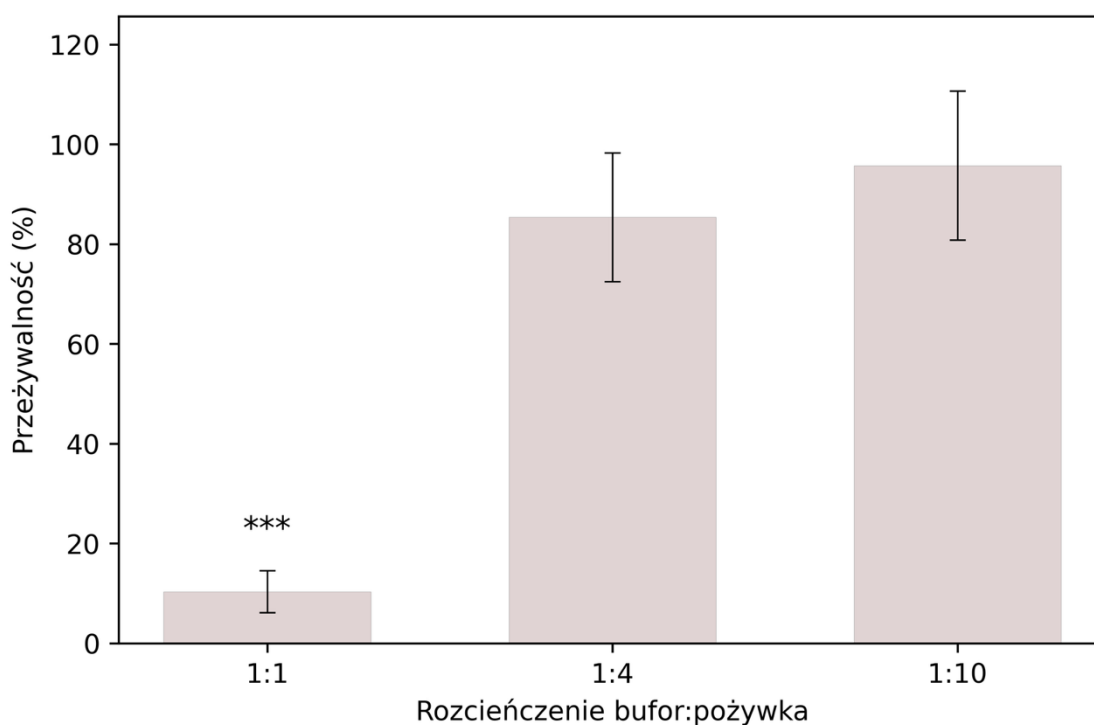
Tabela 4. Wyniki testu post-hoc Tukeya HSD dla porównań wysokości struktur AFM.

Porównanie	Różnica średnich [nm]	p (skorygowana)	Istotność
22,5 vs 225	-9,82	< 0,001	✓
22,5 vs 90	-14,14	< 0,001	✓
22,5 vs HCC	-12,86	< 0,001	✓
225 vs 90	-4,32	0,0002	✓
225 vs HCC	-3,04	0,0019	✓
90 vs HCC	1,28	0,56	✗

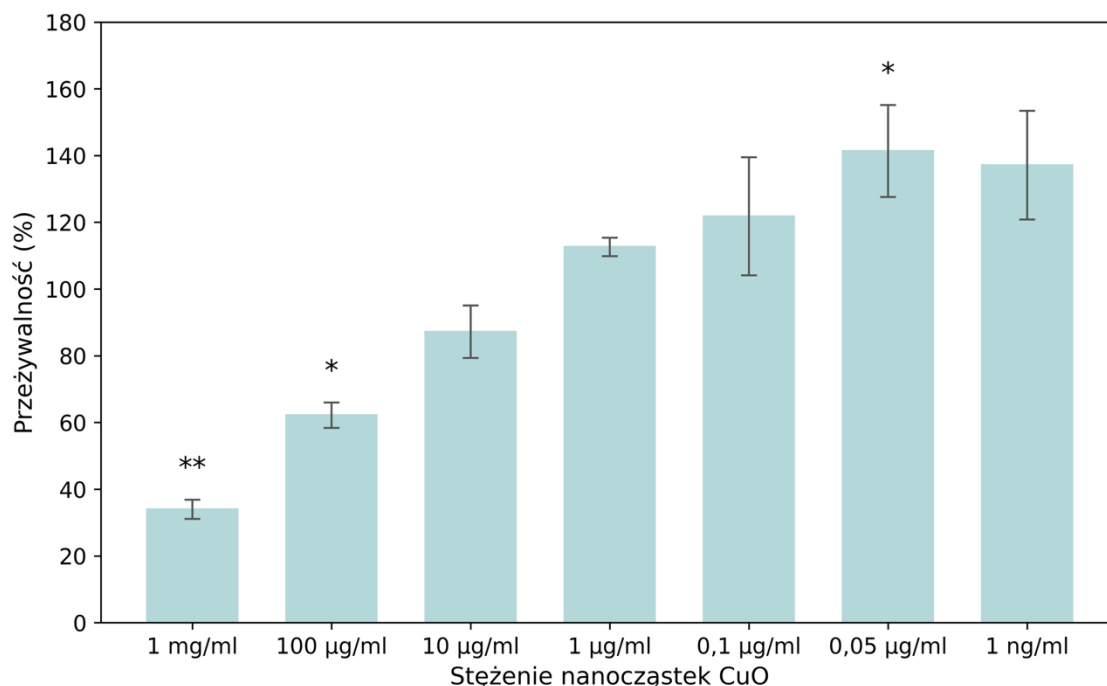
Zmiany morfologii agregatów HCC, mimo zbliżonego udziału elementów struktury drugorzędowej białka, mogą wpływać na właściwości biologiczne i toksyczność, którą można określić w badaniach komórkowych. Aby ocenić ten efekt dla żywych komórek, przeprowadzono testy cytotoksyczności z wykorzystaniem linii neuroblastoma SH-SY5Y. Komórki SH-SY5Y są szeroko stosowanym modelem neuronalnym, a ich fenotyp zbliżony jest do komórek układu nerwowego. Linia ta jest standardowo wykorzystywana w badaniach nad neurodegeneracją, w tym do określenia poziomu toksyczności białek amyloidowych oraz stresu oksydacyjnego [252,253]. Dzięki temu stanowi odpowiedni model do oceny neurotoksycznego potencjału agregatów HCC powstających w obecności nanocząstek CuO.

6.4.3 Ocena cytotoksyczności agregatów HCC i CuO NP na modelową linię komórkową neuroblastomy SH-SY5Y

W pierwszej kolejności oceniono wpływ samego buforu użytego do oligomeryzacji białka HCC na przeżywalność komórek. Jak pokazano na rysunku 64, jedynie rozcieńczony 1:1 bufor wykazywał wyraźny efekt cytotoksyczny, obniżając przeżywalność komórek do ok. 10%. Rozcieńczenie buforu w stosunku 1:4 istotnie zwiększało przeżywalność ($\approx 85\%$), a przy rozcieńczeniu 1:10 przeżywalność była zbliżona do kontroli ($\approx 96\%$). Ponieważ w dalszych eksperymentach stężenie buforu było znacznie niższe niż 1:10, jego potencjalny wpływ na wyniki testów WST-1 można uznać za pomijalny. Jednoczynnikowa analiza wariancji (ANOVA) potwierdziła, że rozcieńczenie buforu istotnie wpływa na przeżywalność komórek SH-SY5Y ($F = 41,0$; $p < 0,0001$). Test post-hoc Tukeya wykazał, że jedynie najwyższe stężenie (1:1) powodowało istotny spadek przeżywalności względem kontroli (medium; $p < 0,001$), natomiast rozcieńczenia 1:4 i 1:10 nie różniły się istotnie od kontroli ($p > 0,05$).



Rysunek 64. Przeżywalność komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji w obecności buforu oligomeryzacyjnego HCC w różnych stopniach rozcieńczenia z pożywką. Wartości przedstawiono jako procentową przeżywalność w stosunku do kontroli (100%), średnie \pm SD z trzech niezależnych pomiarów. Na wykresie poziomy istotności oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

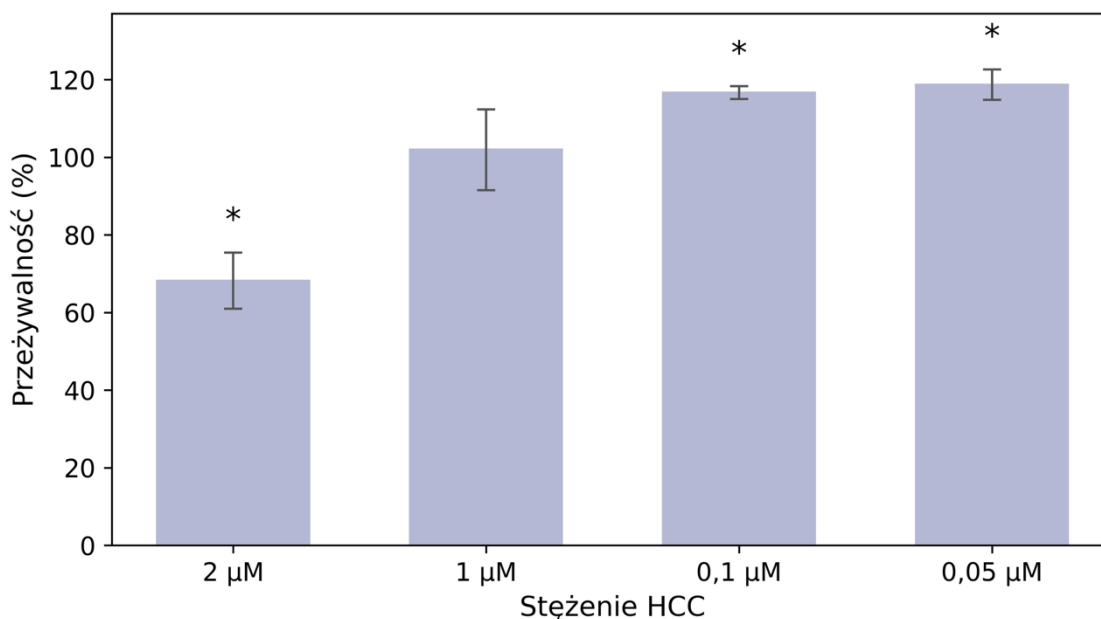


Rysunek 65. Przeżywalność komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji z nanocząstkami CuO. Wartości przedstawiono jako procentową przeżywalność względem kontroli (100%), średnie \pm SD z trzech niezależnych pomiarów. Na wykresie poziomy istotności oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Ponieważ rozcieńczony bufor nie wpływał istotnie na wynik testu, kolejnym etapem badań była ocena działania nanocząstek CuO (rysunek 65). Komórki SH-SY5Y inkubowano przez 24 h z rosnącymi stężeniami CuO, a następnie mierzono ich przeżywalność testem WST-1. Wraz ze spadkiem stężenia CuO obserwowano stopniowy wzrost przeżywalności komórek – od około 35% przy najwyższym stężeniu (1 mg/ml) do wartości zbliżonych lub nieco przekraczających 130–140% przy najniższych stężeniach (0,05 µg/ml i 1 ng/ml). Jak należało się spodziewać, najbardziej wyraźny efekt cytotoksyczny występował przy najwyższych dawkach nanocząstek, natomiast w zakresie poniżej 0,1 µg/ml przeżywalność była porównywalna z kontrolą, czyli komórkami inkubowanymi wyłącznie w pożywce. Istotność różnic między poszczególnymi stężeniami nanocząstek CuO, a odpowiadającymi im próbkami kontrolnymi oceniano za pomocą testu t Welcha, który jest odpowiedni przy niewielkich liczebnościach prób i nierównych wariancjach.

Oligomeryzację HCC przeprowadzono przez 72 h w tych samych stężeniach, które stosowano w analizach fluorescencyjnych. Powstałe agregaty były następnie rozcieńczane do stężeń odpowiednich dla hodowli komórkowej. Po 24 h inkubacji przeżywalność komórek oceniano testem WST-1 (rysunek 66). Ponieważ wcześniejsze testy wykazały, że rozcieńczony bufor nie wpływał istotnie na przeżywalność komórek, jako kontrolę zastosowano standardowe warunki hodowlane, czyli komórki utrzymywane

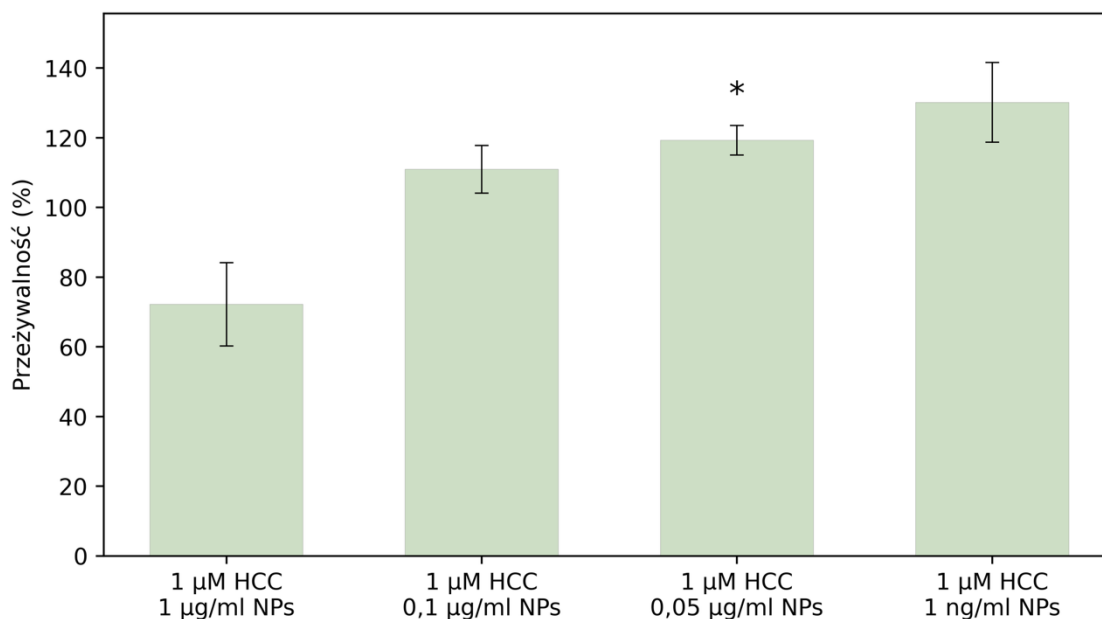
wyłącznie w pożywce. Różnice między próbkami, a kontrolą oceniano testem t-Studenta z poprawką Welcha (dla prób niezależnych), przyjmując poziom istotności $p < 0,05$.



Rysunek 66. Przeżywalność komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji z białkiem HCC. Wartości przedstawiono jako procentową przeżywalność względem kontroli (100%), średnie \pm SD z trzech niezależnych pomiarów. Na wykresie poziomy istotności oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

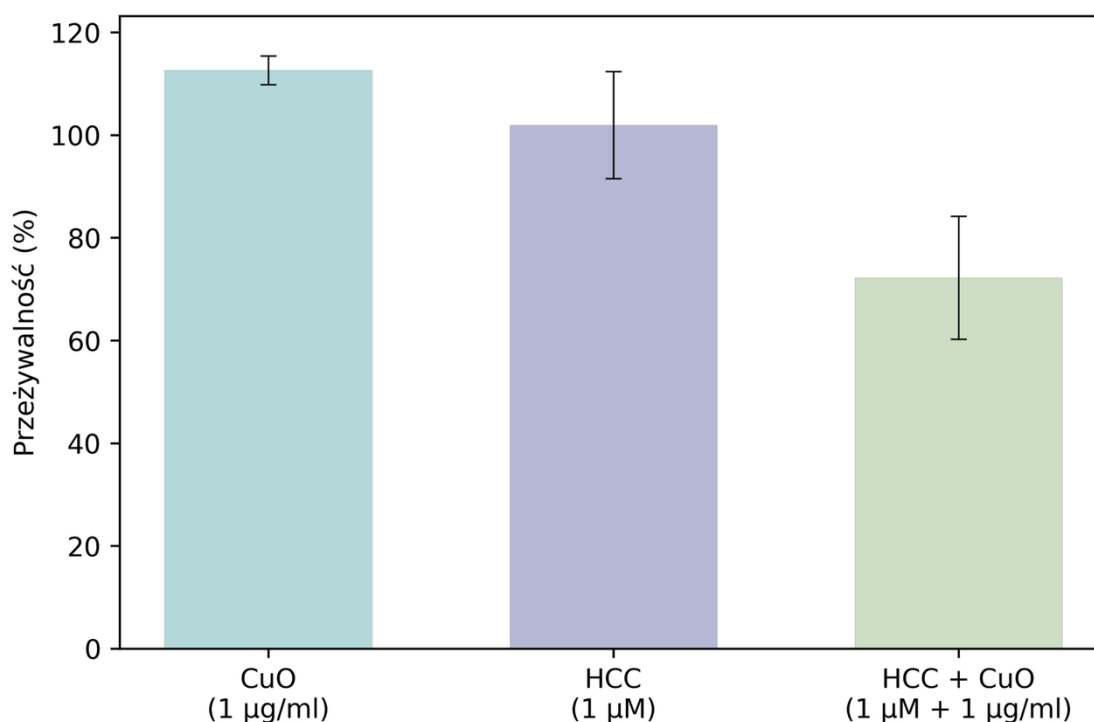
Wraz ze spadkiem stężenia HCC obserwowano systematyczny wzrost przeżywalności komórek. Najniższa przeżywalność (ok. 70%) występowała przy najwyższym stężeniu białka (2 μM). Zmniejszenie stężenia do 1 μM skutkowało wyraźnym zwiększeniem przeżywalności do ok. 100%, a dalsze rozcieńczenie (0,1 μM i 0,05 μM) prowadziło do wartości 115–120%, czyli nieco powyżej poziomu kontroli. W ostatnim etapie badania oceniono wpływ agregatów HCC–CuO, powstałych podczas 72-godzinnej inkubacji białka z nanocząstkami. Do eksperymentu wybrano stężenie HCC (1 μM) oraz serię stężeń CuO (1 $\mu\text{g/ml}$ –1 ng/ml), które w poprzednich testach nie wykazywały istotnej toksyczności wobec komórek SH-SY5Y. Takie warunki umożliwiły ocenę efektu produktów oligomeryzacji przy minimalnym wpływie samych komponentów na przeżywalność komórek.

Jak pokazano na rysunku 67, przeżywalność komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji z agregatami HCC–CuO wykazywała jedynie trend zależny od stężenia nanocząstek CuO. Najniższe wartości (ok. 70%) obserwowano dla próbki z 1 $\mu\text{g/ml}$ CuO, natomiast przy niższych stężeniach ($\leq 0,1$ $\mu\text{g/ml}$) przeżywalność wzrastała do poziomów zbliżonych do kontroli. Różnice te nie były jednak statystycznie istotne (test t-Welcha, $p > 0,05$).



Rysunek 67. Przeżywalność komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji z próbkami HCC inkubowanymi przez 72 h w obecności nanocząstek CuO. Wartości przedstawiono jako procentową przeżywalność względem kontroli (100%), średnie \pm SD z trzech niezależnych pomiarów. Na wykresie poziomy istotności oznaczono gwiazdkami: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

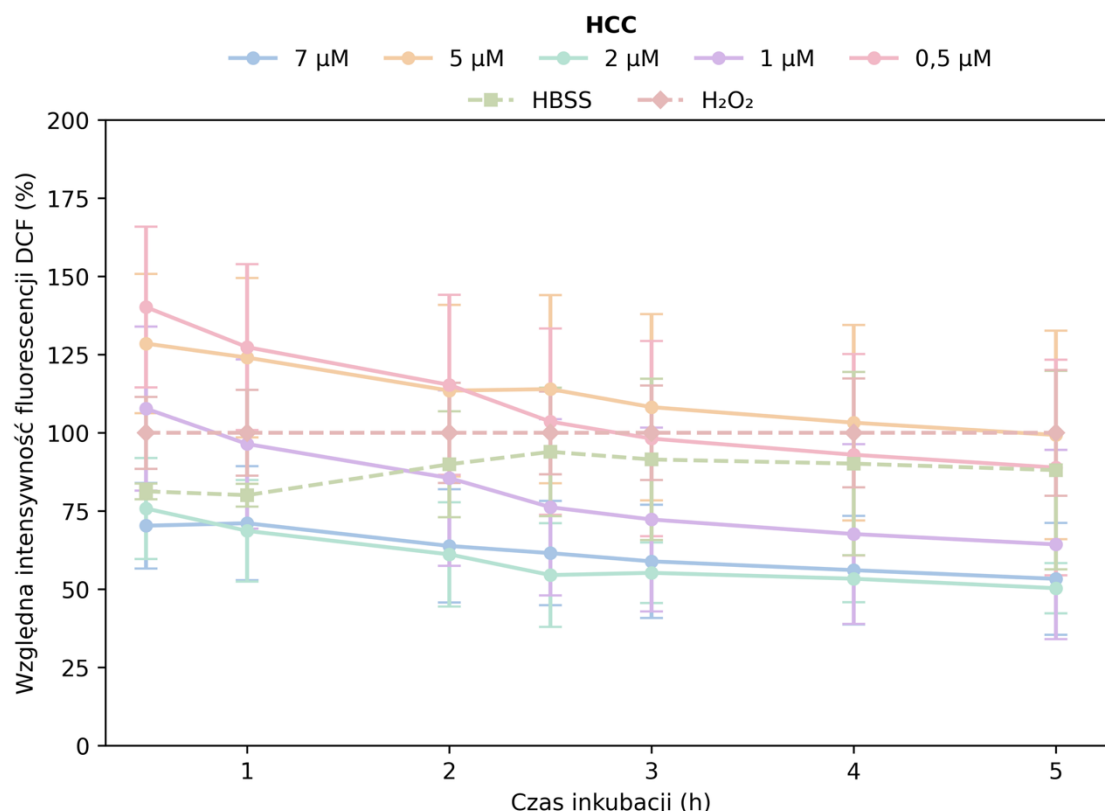
Przeprowadzone testy cytotoksyczności umożliwiły również oddzielną ocenę wpływu poszczególnych komponentów - buforu, białka HCC, nanocząstek CuO oraz ich mieszaniny. Jak pokazano na rysunku 68, jedynie jednoczesna obecność HCC i CuO NPs (1 μ M HCC + 1 μ g/ml CuO) wiązała się z wyraźnym trendem obniżenia przeżywalności komórek ($\approx 70\%$), podczas gdy każdy z tych składników osobno nie wykazywał takiego efektu. Różnice te nie osiągnęły poziomu istotności statystycznej (t-Welch, $p > 0,05$), co wynikało z podwyższonej zmienności pomiarów, w tym pojedynczej wartości odbiegającej. Mimo braku istotności statystycznej obserwowany trend sugeruje, że zmiany zachodzące podczas wspólnej inkubacji białka i nanocząstek mogą wpływać na odpowiedź komórek.



Rysunek 68. Podsumowanie testów przeżywalności komórek SH-SY5Y po 24 h inkubacji z nanocząstkami CuO, białkiem HCC oraz HCC + CuO NPs, wszystkie uprzednio inkubowane przez 72 h. Wartości przedstawiono jako procent przeżywalności względem kontroli (100%). Dane zaprezentowano jako średnie \pm SD z trzech niezależnych pomiarów. Analiza statystyczna (test t Welcha vs. kontrola – pożywka) nie wykazała istotnych różnic ($p > 0,05$).

Aby ocenić, czy zaobserwowana toksyczność mieszaniny białko HCC–nanocząstki CuO może być związana ze stresem oksydacyjnym, przeprowadzono pomiary reaktywnych form tlenu (ROS). Próbkami białka HCC oraz HCC + CuO NPs były wcześniej inkubowane przez 72 h w warunkach sprzyjających oligomeryzacji białka (50 mM octan sodu, 100 mM NaCl, pH 4, 47°C, 700 rpm). Komórki SH-SY5Y inkubowano następnie przez 24 h z badanymi próbkami, a intensywność fluorescencji DCF (2',7'-dichlorodihydrofluoresceiny) wyrażono względem kontroli pozytywnej (H₂O₂). Stężenie buforu w próbkach po rozcieńczeniu do warunków hodowlanych było niższe niż 1:10, czyli w zakresie, który w wcześniejszych testach nie wpływał ani na przeżywalność komórek, ani na sygnał fluorescencji, dlatego nie oczekiwano jego istotnego wpływu na pomiar ROS. Pomiary wykonywano w siedmiu punktach czasowych, od 0,5 do 5 godzin inkubacji, a każda próbka była analizowana w trzech powtórzeniach biologicznych. Badanie obejmowało trzy główne grupy próbek: białko HCC w zakresie stężeń 0,5–7 µM, nanocząstki CuO w zakresie 0,1–100 µg/ml oraz mieszaniny 1 µM HCC z CuO NPs. Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono osobno dla każdego punktu czasowego. W pierwszym etapie analizowano wpływ stężenia HCC oraz CuO NPs na poziom generacji ROS. W tym celu, niezależnie dla każdego punktu czasowego, zastosowano jednoczynnikową analizę wariancji ANOVA. W przypadku białka HCC (rysunek 69) nie zaobserwowano zależności sygnału DCF od zastosowanego stężenia w czasie trwania eksperymentu. Choć wczesne punkty czasowe

(0,5–1 h) charakteryzowały się przejściowymi wzrostami sygnału DCF dla niektórych stężeń, efekty te miały charakter krótkotrwały i nie utrzymywały się w czasie. W kolejnych godzinach wartości fluorescencji stabilizowały się, nie wykazując zależności od dawki. Uzyskane z analizy statystycznej wartości p (tabela 5) wskazują jedynie na obecność słabych trendów statystycznych ($p = 0,05–0,1$), natomiast nie potwierdzają występowania różnic istotnych statystycznie ($p < 0,05$), co interpretowano jako brak istotności statystycznej (ang. not significant, ns). Otrzymane dane jednoznacznie sugerują, że oligomery HCC stosowane w zakresie stężeń 0,5–7 μM nie indukują trwałego ani jednoznacznego wzrostu poziomu generacji ROS w komórkach SH-SY5Y.



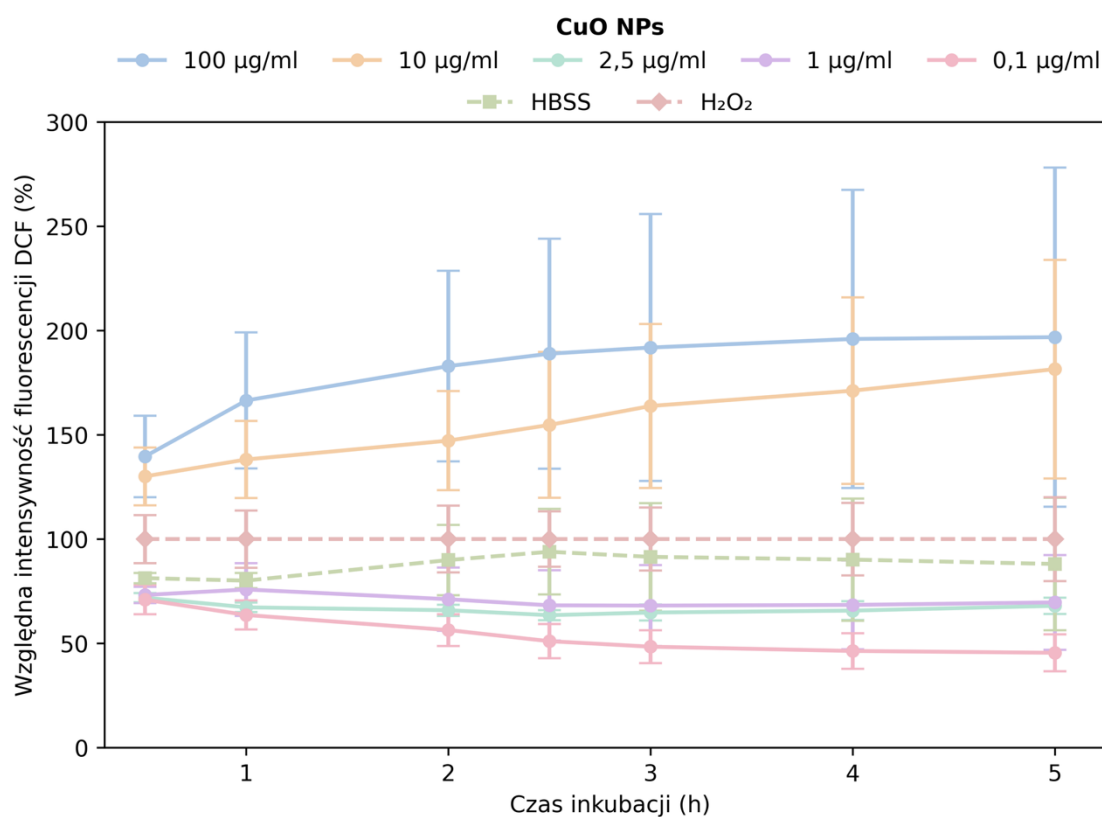
Rysunek 69. Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y inkubowanych z HCC w różnych stężeniach w czasie do 5 h, w obecności buforu HBSS. Wartości procentowe względem kontroli dodatniej ($\text{H}_2\text{O}_2 = 100\%$).

Tabela 5. Wyniki analizy wariancji (ANOVA) dla sygnału fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y traktowanych białkiem HCC. Wartość F to statystyka testu Fishera-Snedecora używana do oceny różnic między grupami.

Czas inkubacji	F	p	Istotność
0,5h	2,66	0,096	(trend)
1h	2,36	0,124	ns
2h	2,46	0,113	ns
2,5h	3,03	0,070	(trend)
3h	2,94	0,076	(trend)
4h	3,01	0,072	(trend)
5h	3,01	0,072	(trend)

* = $p < 0,05$ (trend) = $0,05 < p < 0,1$ ns = $p \geq 0,1$

Odmienną zależność zaobserwowano dla nanocząstek CuO (rysunek 70). W tym przypadku analiza ANOVA (tabela 6) wykazała wyraźny wpływ stężenia na generację ROS, szczególnie w późniejszych punktach pomiarowych. Najwyższe dawki (10 i 100 $\mu\text{g/ml}$) powodowały stopniowy, utrzymujący się wzrost sygnału fluorescencji, przewyższający wartości kontroli dodatniej. Z kolei niższe stężenia (0,1–1 $\mu\text{g/ml}$) nie różniły się od kontroli negatywnej i nie prowadziły do zwiększonej produkcji ROS, co może wskazywać na obecność progu stężeniowego, powyżej którego ujawnia się toksyczny charakter CuO NPs.



Rysunek 70. Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y po ekspozycji na nanocząstki CuO (0,1–100 $\mu\text{g/ml}$) w czasie 0,5–5 h. Wartości procentowe względem kontroli dodatniej (H₂O₂ = 100%).

Tabela 6. Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) dla sygnału fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y traktowanych nanocząstkami CuO (0,1–100 µg/ml). Wartość F to statystyka testu Fishera-Snedecora używana do oceny różnic między grupami.

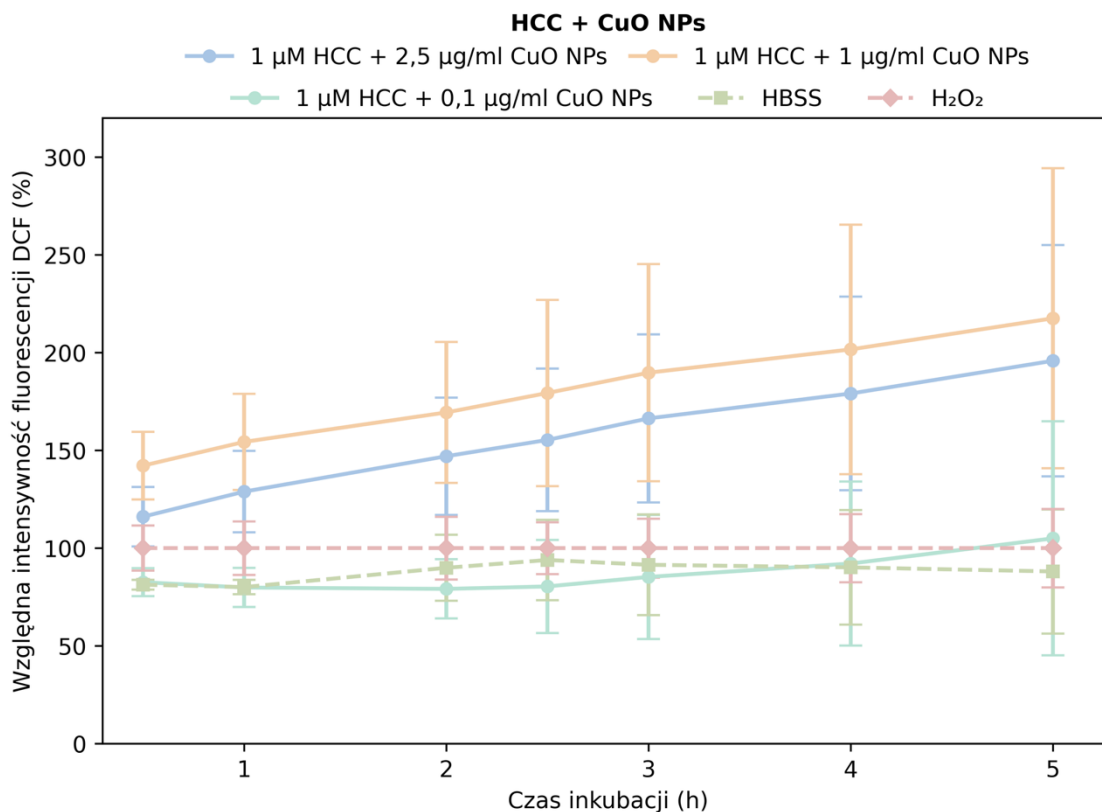
Czas inkubacji	F	p	Istotność
0,5h	11,78	<0,001	*
1h	11,02	0,001	*
2h	11,80	<0,001	*
2,5h	11,85	<0,001	*
3h	11,69	<0,001	*
4h	11,84	<0,001	*
5h	11,51	<0,001	*

* = $p < 0,05$ (trend) = $0,05 < p < 0,1$ ns = $p \geq 0,1$

Wyniki jednoczynnikowej analizy wariancji ANOVA zestawione w tabeli 6 potwierdzają istotny wpływ stężenia CuO NPs na poziom sygnału DCF we wszystkich analizowanych punktach czasowych ($p < 0,001$). Wysokie wartości statystyki F wskazują, że różnicowanie między grupami było wyraźnie większe niż zmienność wewnątrz grup, co potwierdza silny efekt dawki. Otrzymane wyniki wskazują, że CuO NPs indukują stres oksydacyjny w sposób zależny od stężenia.

W drugim etapie analizowano próbki, w których białko HCC było wspólnie inkubowane z nanocząstkami CuO. Celem było ustalenie czy agregaty HCC powstające w obecności CuO NPs generują wyższy poziom ROS niż każdy z komponentów osobno.

Rysunek 71 przedstawia względną intensywność fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y po ekspozycji na białko HCC (1 µM) inkubowane z nanocząstkami CuO w różnych stężeniach (0,1–2,5 µg/ml) w przedziale czasowym 0,5–5 h. Najwyższe stężenia CuO NPs (1 i 2,5 µg/ml) powodowały stopniowy i systematyczny wzrost intensywności fluorescencji w czasie, osiągając wartości znacząco przekraczające poziom sygnału generowany przez samo białko HCC. Niższe stężenie CuO (0,1 µg/ml) nie prowadziło do wyraźnej zmiany poziomu ROS i pozostawało zbliżone do kontroli negatywnej (bufor HBSS). Dla tej części analiz zastosowano dwustronny test t-Welcha, który jest odpowiedni przy niewielkiej liczbie powtórzeń oraz nierównych wariancjach. Porównania wykonywano dla każdego czasu inkubacji, zestawiając próbki HCC + CuO NPs zarówno z odpowiadającymi im stężeniami białka oraz nanocząstek. Analiza wykazała, że próbki zawierające 1 µM HCC i 1 lub 2,5 µg/ml CuO NPs wywołują istotnie silniejszą produkcję ROS niż same te komponenty w badanych stężeniach. Efekt ten pojawiał się już w pierwszych godzinach inkubacji i utrzymywał do końca pomiarów, co wskazuje na nasilony stres oksydacyjny związany z obecnością agregatów.

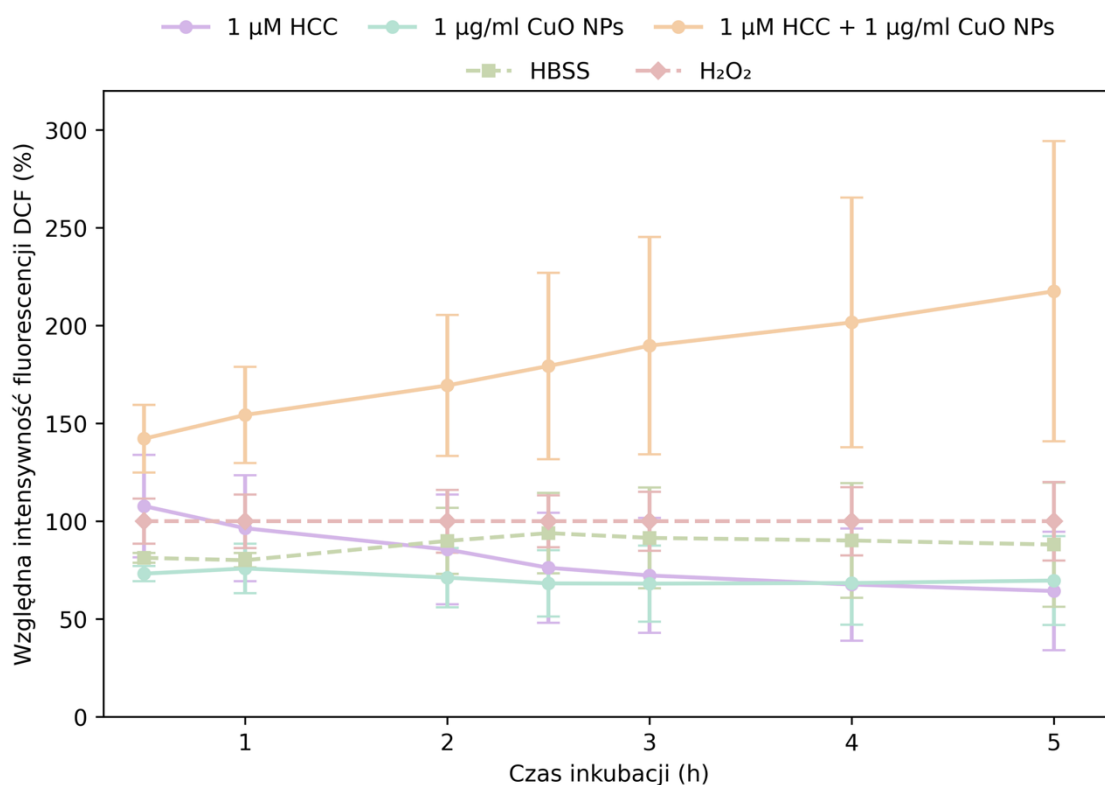


Rysunek 71. Względna intensywność fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y po inkubacji z HCC (1 μM) i nanocząstkami CuO w różnych stężeniach (2,5 $\mu\text{g/ml}$, 1 $\mu\text{g/ml}$, 0,1 $\mu\text{g/ml}$) oraz różnych przedziałach czasowych. Wartości procentowe względem kontroli dodatniej ($\text{H}_2\text{O}_2 = 100\%$).

Tabela 7 przedstawia porównanie poziomu generacji reaktywnych form tlenu w próbkach zawierających 1 μM HCC inkubowane z nanocząstkami CuO (0,1–2,5 $\mu\text{g/ml}$) względem odpowiadających im stężeń samego białka HCC oraz samych CuO NPs. Analiza wykazała, że najniższe stężenie nanocząstek (0,1 $\mu\text{g/ml}$) nie wpływało na poziom generacji ROS w obecności 1 μM HCC - we wszystkich punktach czasowych różnice względem samego białka oraz odpowiadających stężeń CuO NPs były nieistotne statystycznie (ns). Wyraźny efekt pojawia się dopiero dla mieszaniny 1 μM HCC + 1 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs. W tym przypadku sygnał DCF jest istotnie wyższy od wartości uzyskiwanych dla samego CuO w całym zakresie czasowym ($p < 0,05$), a w porównaniu z samym HCC różnice stają się istotne od 2,5 h i utrzymują się do 5 h. Dla próbki 1 μM HCC + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs obserwuje się podobny, lecz nieco słabszy efekt - we wczesnych punktach czasowych dominują jedynie trendy, a pełna istotność względem CuO NPs pojawia się dopiero od 3 h. Oznacza to, że najsilniejszy i najwcześniejszy efekt synergiczny HCC + CuO w badanym zakresie stężeń występuje w obecności nanocząstek o stężeniu 1 $\mu\text{g/ml}$.

Tabela 7 Porównanie poziomu generacji reaktywnych form tlenu (ROS) w próbkach zawierających 1 μM HCC inkubowane z nanocząstkami CuO NPs (0,1–2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) względem odpowiadających im stężeń samego białka HCC oraz samych CuO NPs. Analiza wykonana testem t-Welcha dla każdego punktu czasowego osobno. Symbol „*” oznacza $p < 0,05$ (różnice istotne statystycznie), zakres 0,05–0,1 interpretowano jako trend statystyczny („trend”), natomiast $p \geq 0,1$ traktowano jako brak istotności statystycznej (ang. not significant, ns).

Próbka	Porównanie z	0,5h	1h	2h	2,5h	3h	4h	5h
1 μM HCC + 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	1 μM HCC	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1 μM HCC + 0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	0,1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
1 μM HCC + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	1 μM HCC	ns	ns	(trend)	*	*	*	*
1 μM HCC + 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	*	*	*	*	*	*	*
1 μM HCC + 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	1 μM HCC	ns	ns	(trend)	*	*	*	*
1 μM HCC + 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ CuO NPs	(trend)	(trend)	(trend)	(trend)	*	*	*



Rysunek 72. Porównanie względnej intensywności fluorescencji DCF w komórkach SH-SY5Y po 5 h inkubacji w obecności białka HCC (1 μM), nanocząstek CuO (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$) oraz ich kompleksu, uprzednio inkubowanych przez 72 h. Wartości procentowe względem kontroli dodatniej (H₂O₂ = 100%).

Zebrane dane pozwalają stwierdzić, że samo białko HCC nie generuje trwałego wzrostu poziomu ROS, natomiast nanocząstki CuO wywołują silną, zależną od dawki odpowiedź oksydacyjną dopiero powyżej określonego progu stężenia. Najsilniejszą produkcję ROS obserwuje się w układach, w których białko HCC było inkubowane z nanocząstkami CuO, co wskazuje na synergiczne oddziaływanie obu składników oraz na toksyczny potencjał agregatów. Dla przejrzystego porównania aktywności poszczególnych składników oraz ich mieszaniny przedstawiono wyniki wytwarzania reaktywnych form tlenu (ROS) dla stężeń 1 μ M HCC i 1 μ g/ml CuO NPs (rysunek 72).

Uzyskane wyniki stanowią dodatkowy kontekst dla dalszych badań prowadzonych w warunkach mikroprzepływowych, w ramach których - oprócz oceny wpływu przepływu mikrofluidycznego na proces agregacji samego białka HCC - zdecydowano się również przeanalizować, jak przepływ wpływa na agregację białka w obecności nanocząstek CuO.

6.4.4 Wpływ warunków mikroprzepływowych na proces agregacji HCC

W ramach realizacji pracy doktorskiej samodzielnie skonstruowano oraz zoptymalizowano kompletny układ mikroprzepływowy umożliwiający długoterminową cyrkulację próbek białek w kontrolowanych warunkach fizykochemicznych. Poza integracją komercyjnych komponentów (kontrolera ciśnienia OB1PC, chipu mikrofluidycznego oraz zaworu MUX 6/2), konieczne było zaprojektowanie konfiguracji połączeń, odpowiedniego układu przewodów oraz parametrów pracy, które pozwalały na uzyskanie stabilnego i powtarzalnego przepływu przez pięciometrowy, serpentynowy kanał mikrochipu.

Istotnym elementem prac konstrukcyjnych była implementacja zaworu MUX 6/2 w trybie recyrkulacji. Opracowana konfiguracja umożliwiła stworzenie zamkniętego obiegu cieczy, w którym próbka mogła być wielokrotnie kierowana przez mikrochip bez konieczności jakiegokolwiek ingerencji manualnej. Pozwoliło to na znaczące usprawnienie całego procesu eksperymentalnego oraz zwiększenie możliwości prowadzenia czasochłonnych badań w stabilnych warunkach.

Dzięki uzyskanej optymalizacji układ mikroprzepływowy stał się konstrukcyjnie stabilny, łatwy do ponownego montażu i w pełni przenośny. Umożliwiło to jego bezproblemowy transport do ośrodka DESY w Hamburgu na potrzeby eksperymentów synchrotronowych. Mobilność systemu była kluczowa, ponieważ podczas sesji pomiarowej możliwe było równoległe przygotowywanie kolejnych próbek w identycznych warunkach mikroprzepływowych i ich bezpośrednia analiza metodą SAXS.

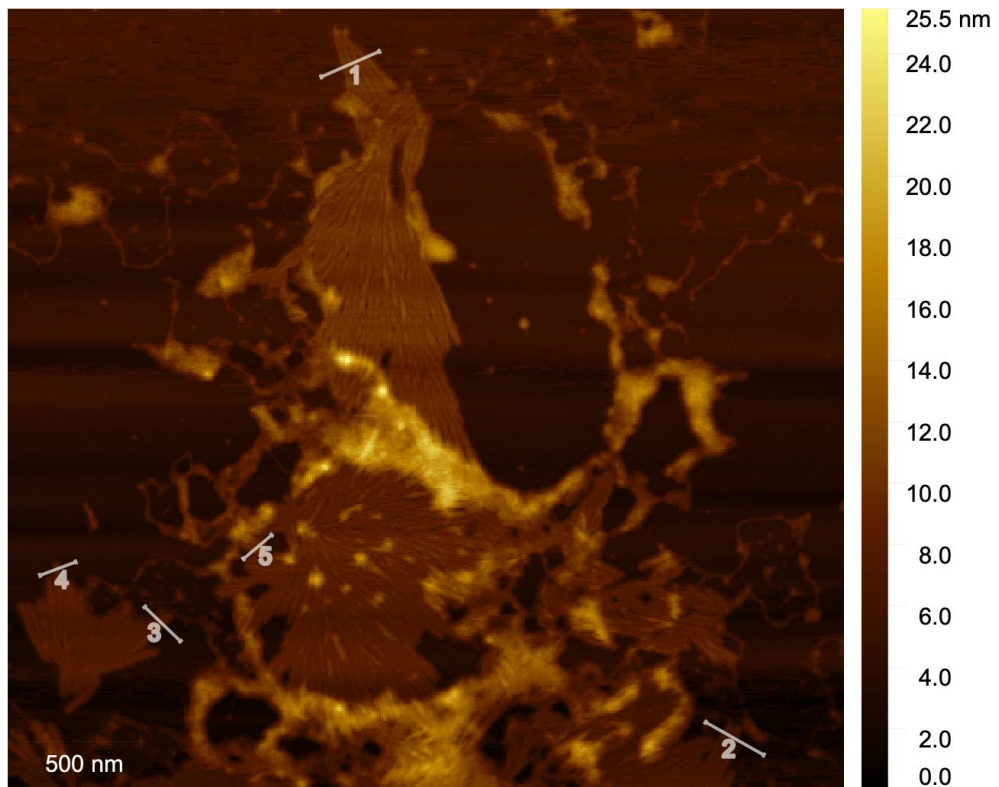
Wykorzystując opracowany i zoptymalizowany układ przeprowadzono następnie eksperymenty oceniające wpływ mikroprzepływu na procesy agregacji ludzkiej cystatyny C oraz jej oddziaływania z nanocząstkami CuO. Parametry dobrano w oparciu o wcześniejsze obserwacje A. Grubba i współpracowników [254], którzy wykazali, że podwyższona temperatura znacząco przyspiesza proces agregacji cystatyny C oraz sprzyja przechodzeniu białka w formy oligomeryczne. Dlatego wybrane warunki

pozwalają na uzyskanie mierzalnych zmian strukturalnych w rozsądnym czasie eksperymentu.

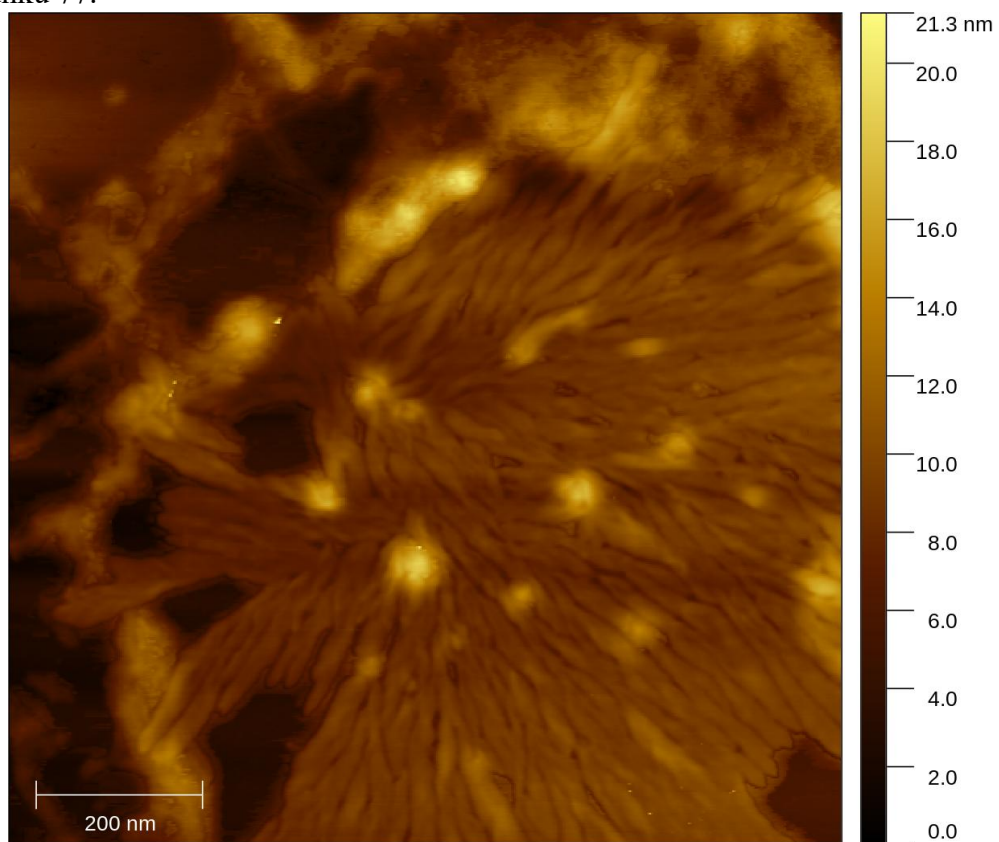
Po 8 godzinach cyrkulacji w kontrolowanej temperaturze 47°C pobrano próbki do dalszych analiz morfologicznych. Topografię powierzchni badano przy użyciu mikroskopii sił atomowych (AFM), co umożliwiło ocenę wpływu środowiska przepływowego na powstawanie struktur agregacyjnych w różnych warunkach pH oraz w obecności nanocząstek CuO.

Pomimo braku wyraźnych oznak agregacji amyloidogennej w eksperymentach prowadzonych z wykorzystaniem tioflawiny T podczas wytrząsania (700 rpm) w temperaturze 47°C na czytniku płytek przy pH 6 (rozdz. 6.4.2), w niniejszym eksperymencie analiza obrazów AFM ujawniła obecność wyraźnie wydłużonych nanostruktur o morfologii przypominającej fibryle (rysunki 73–76).

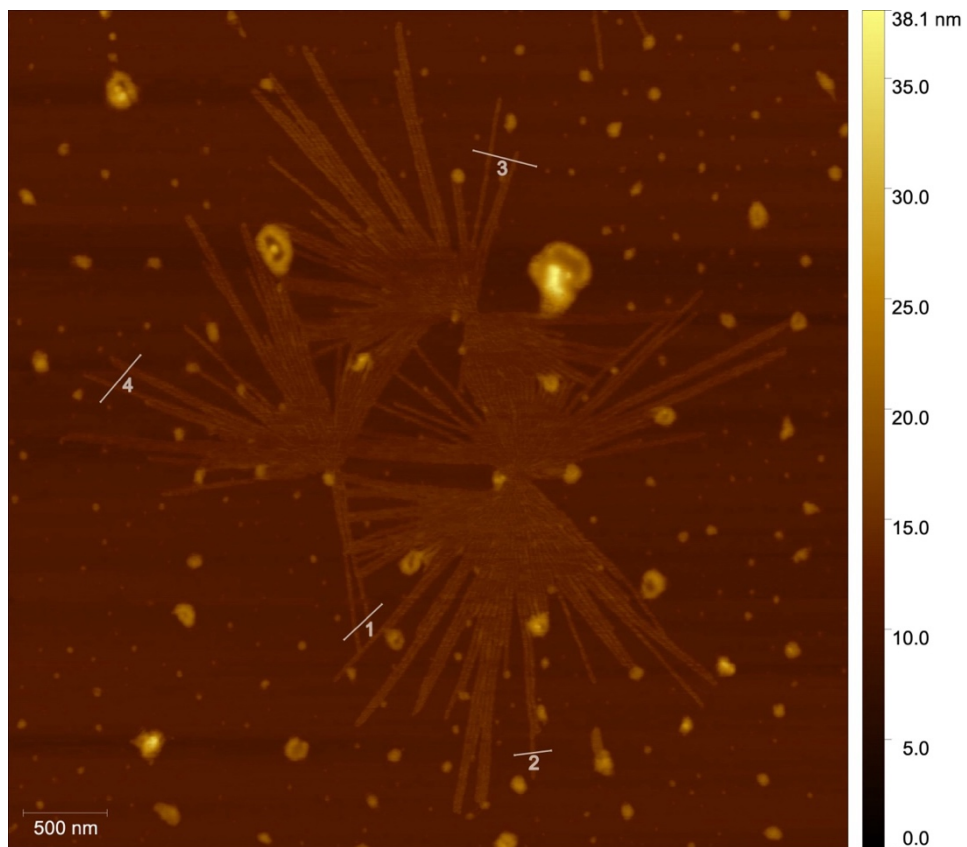
W wielu obszarach próbki struktury te tworzą promieniste układy, prowadzące do powstawania lokalnych skupisk przypominających centra wzrostu agregatów. Tego typu organizacja może wskazywać na inicjację procesów agregacyjnych lub uporządkowaną samoorganizację białka indukowaną warunkami przepływu. Analiza profili wysokości wybranych struktur, przedstawiona na rysunku 77, umożliwia ilościową charakterystykę ich wymiarów oraz potwierdza ich nanometryczny charakter.



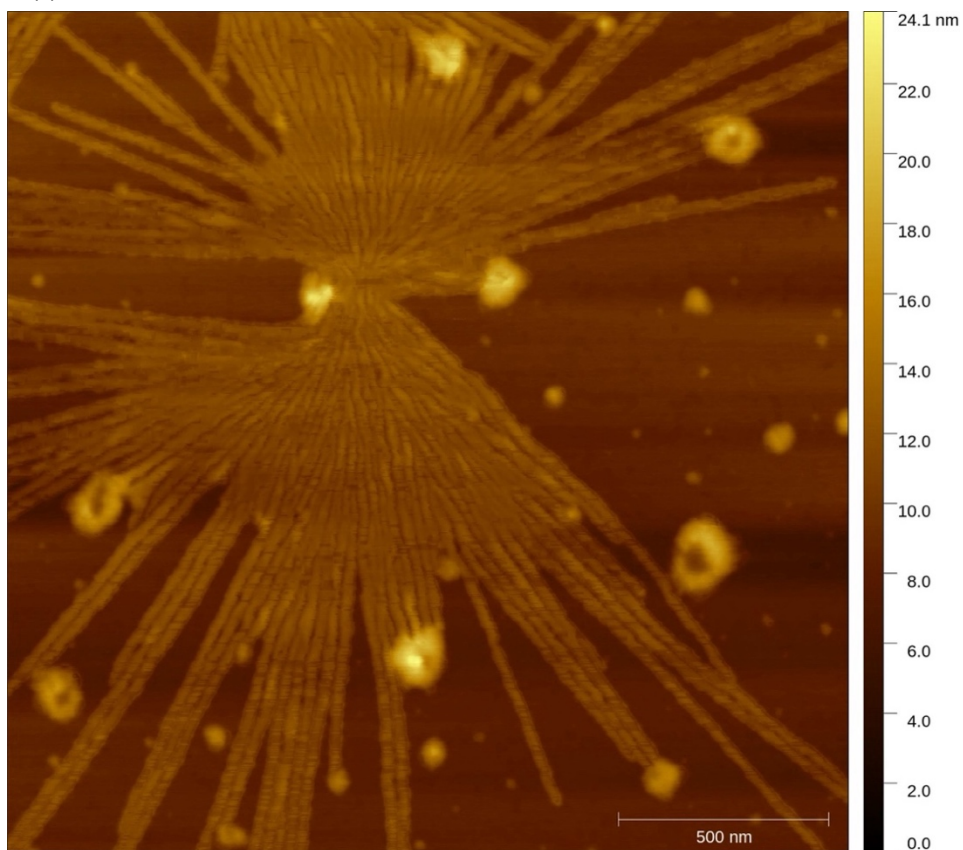
Rysunek 73. Obraz AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 6. Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 77.



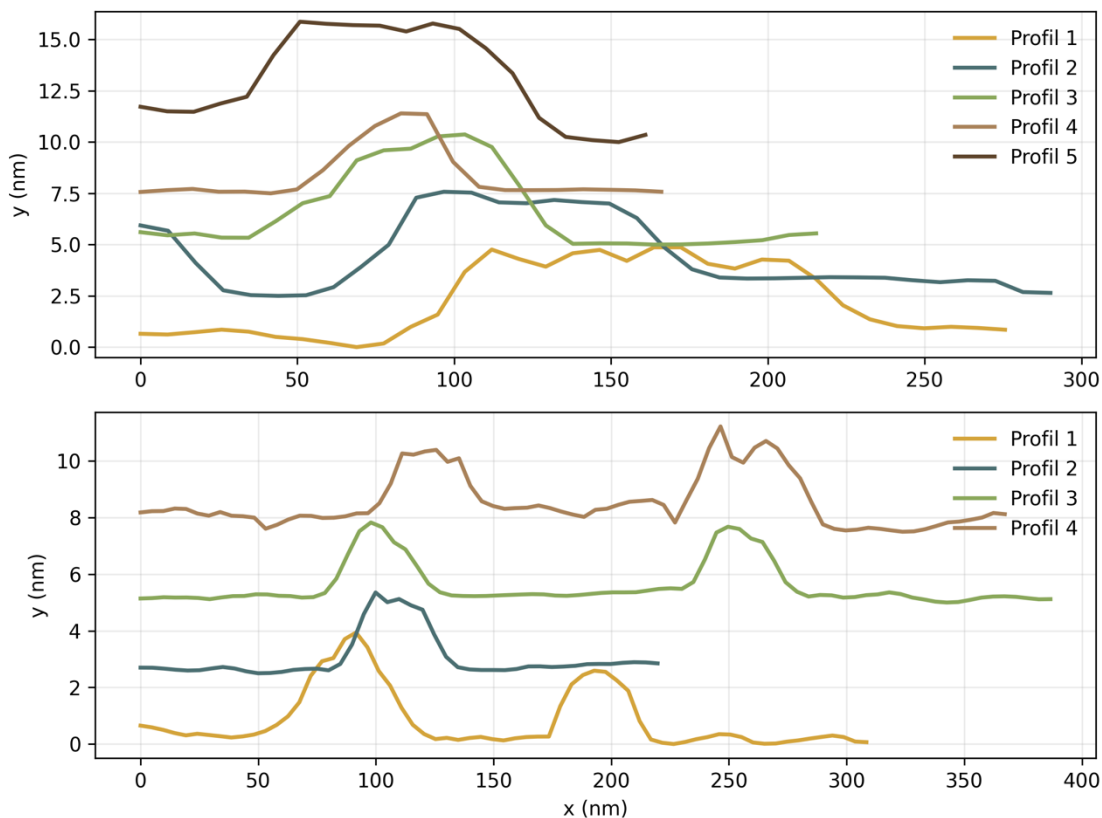
Rysunek 74. Obraz AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 6.



Rysunek 75. Obraz AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 6. Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 77.

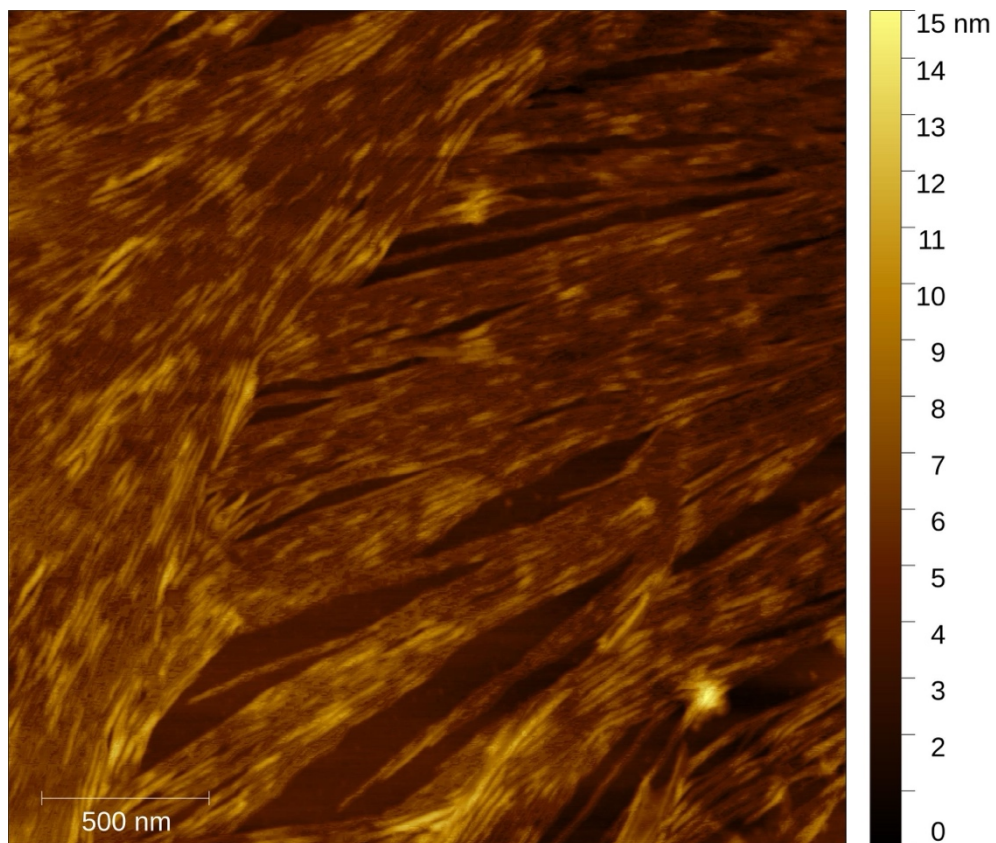


Rysunek 76. Obrazy AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 6.

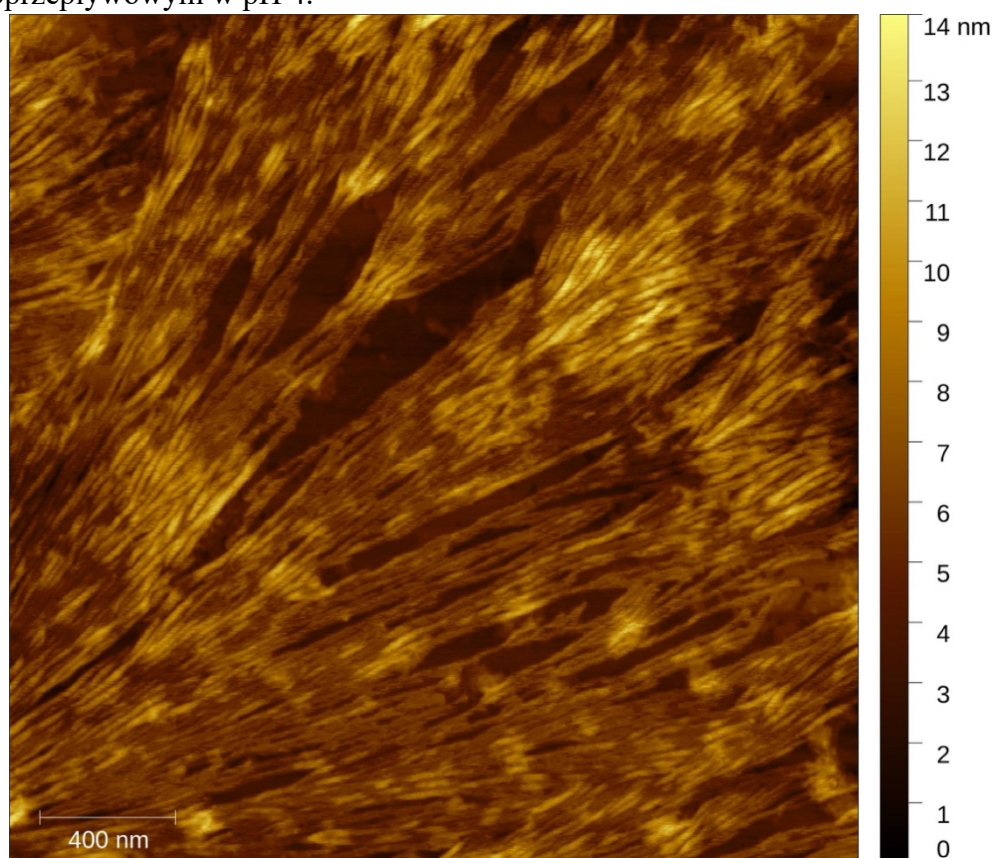


Rysunek 77. Zestawienie przykładowych profili wysokości struktur fibrylarnych uzyskanych z obrazów AFM próbek HCC inkubowanych w pH 6 przez 8 h w przepływie mikrofluidycznym. Panel (a) przedstawia pięć profili wysokości nanostruktur wyznaczonych na rysunku 73, natomiast panel (b) pokazuje cztery profile z rysunku 75. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.

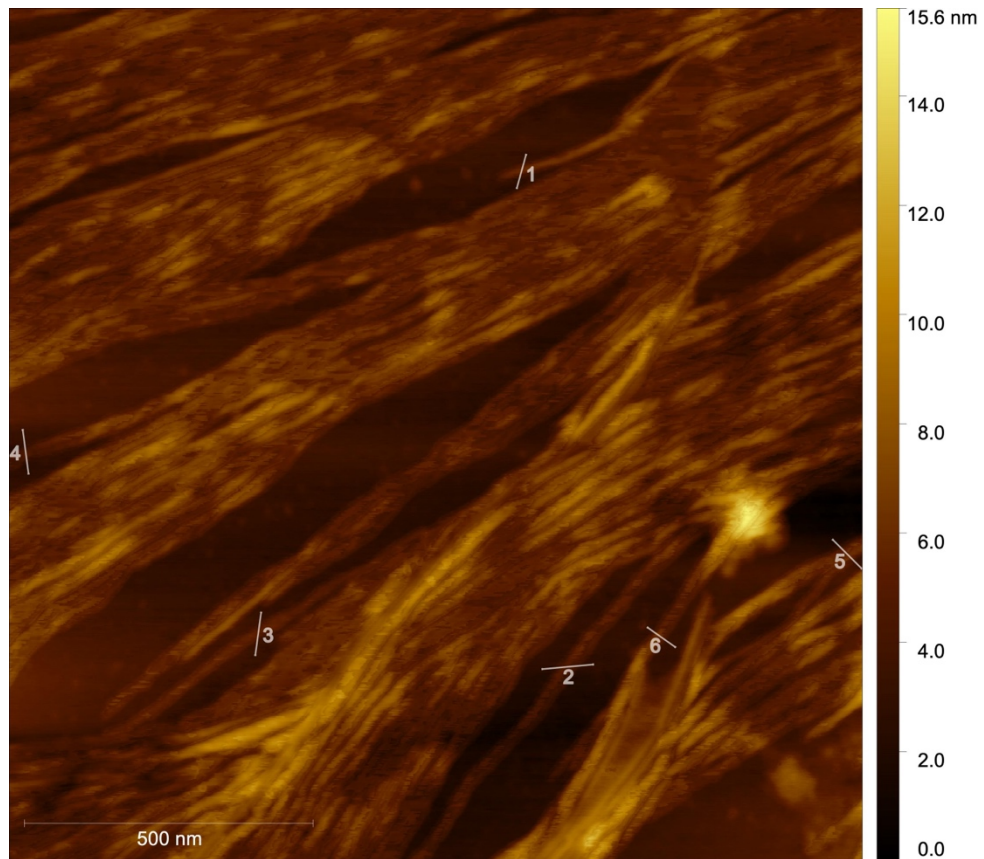
Natomiast w środowisku kwaśnym (pH 4) po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym zaobserwowano wyraźnie fibrylarne struktury (rysunki 78-80). Na obrazach AFM widoczne są gęsto upakowane, równoległe ułożone włóknikowate formacje, tworzące zwarte i uporządkowane sieci. W przeciwieństwie do próbek w pH 6, nie obserwuje się promienistych układów przypominających centra wzrostu, lecz rozległe struktury włókniste, charakterystyczne dla zaawansowanych etapów procesu agregacji. Analiza profili wysokości została przedstawionych na rysunku 81.



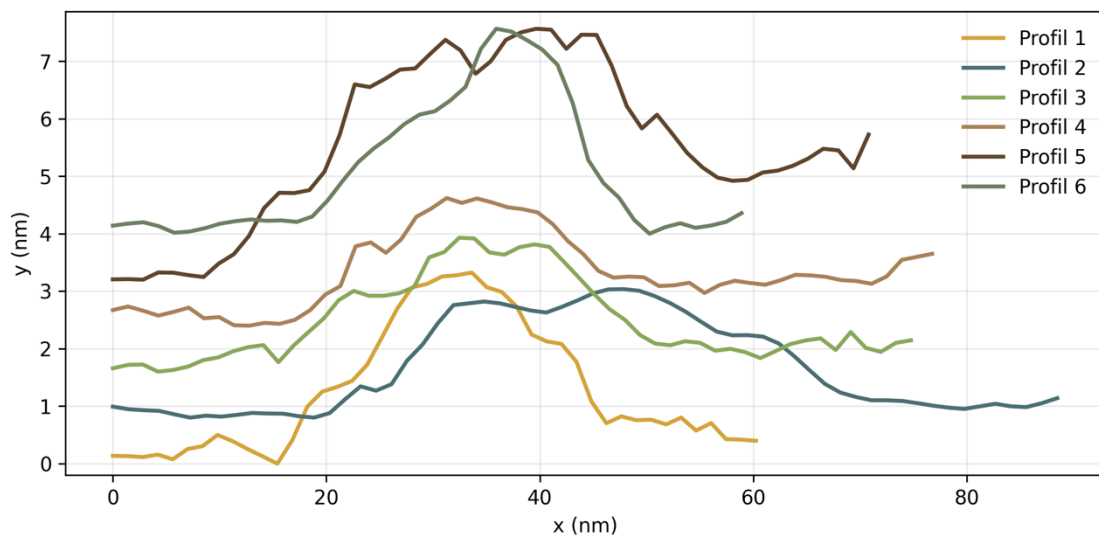
Rysunek 78. Obrazy AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 4.



Rysunek 79. Obrazy AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 4.

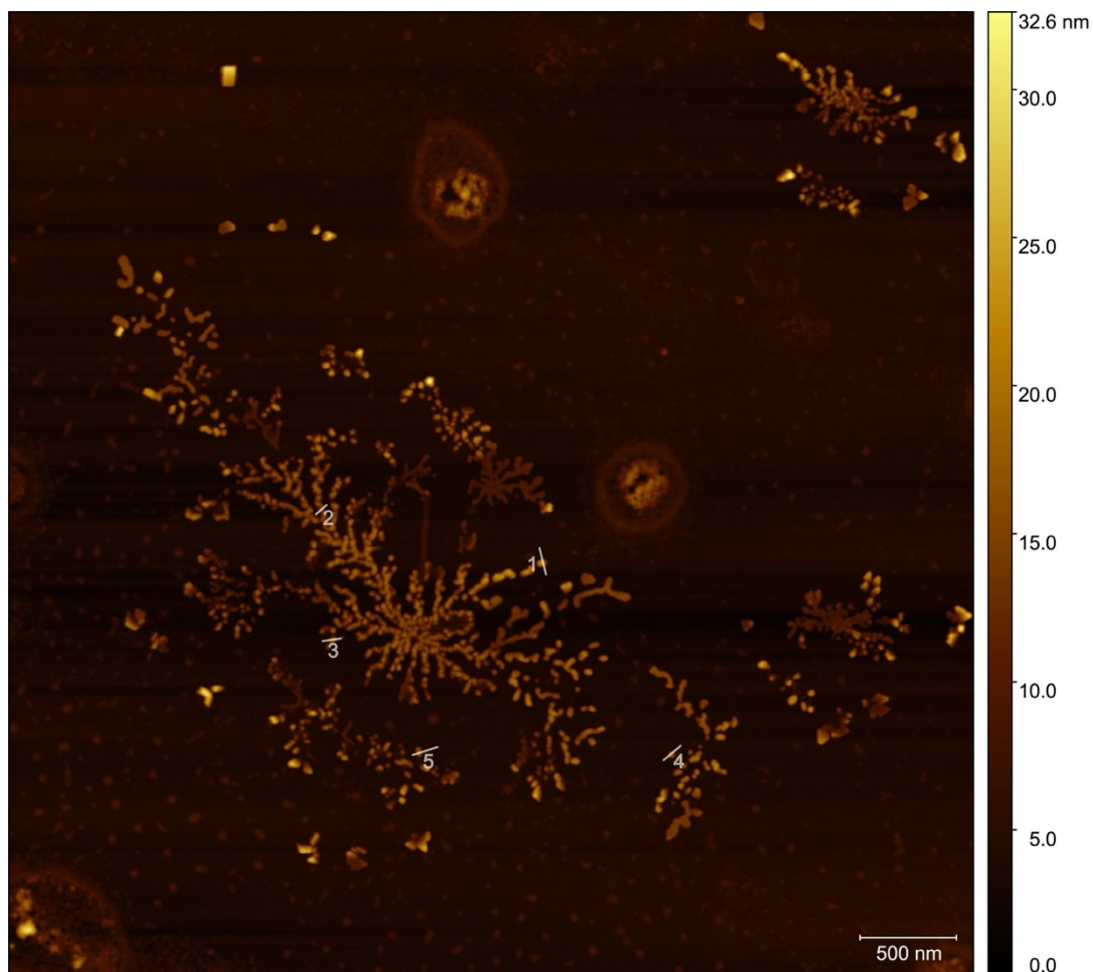


Rysunek 80. Obrazy AFM próbek HCC po 8 godzinach cyrkulacji w układzie mikroprzepływowym w pH 4. Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 81.

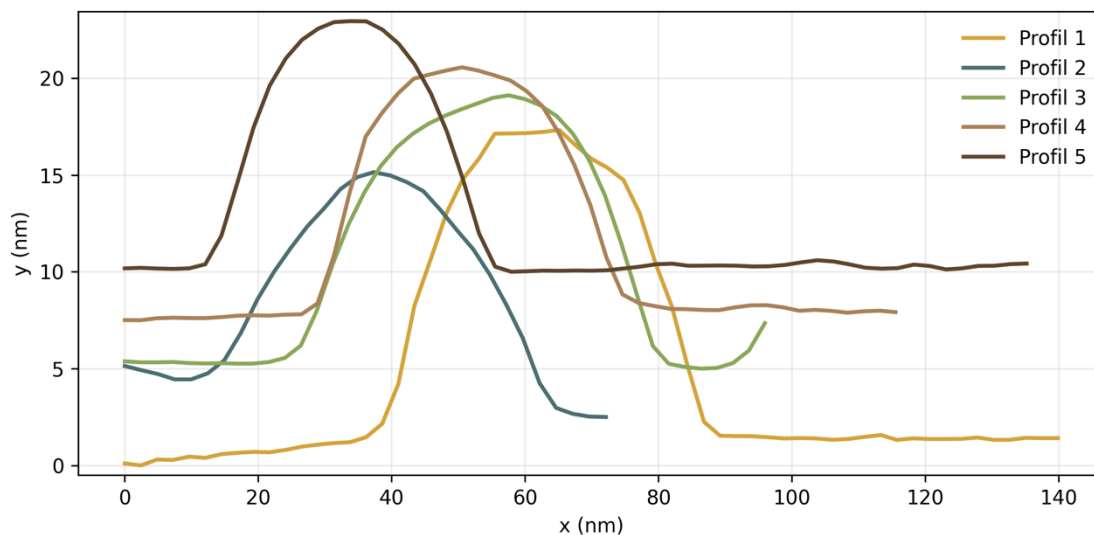


Rysunek 81. Zestawienie przykładowych profili wysokości struktur fibrylnych wyznaczonych na rysunku 80 dla próbek HCC inkubowanych w pH 4 przez 8 h w przepływie mikrofluidycznym. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.

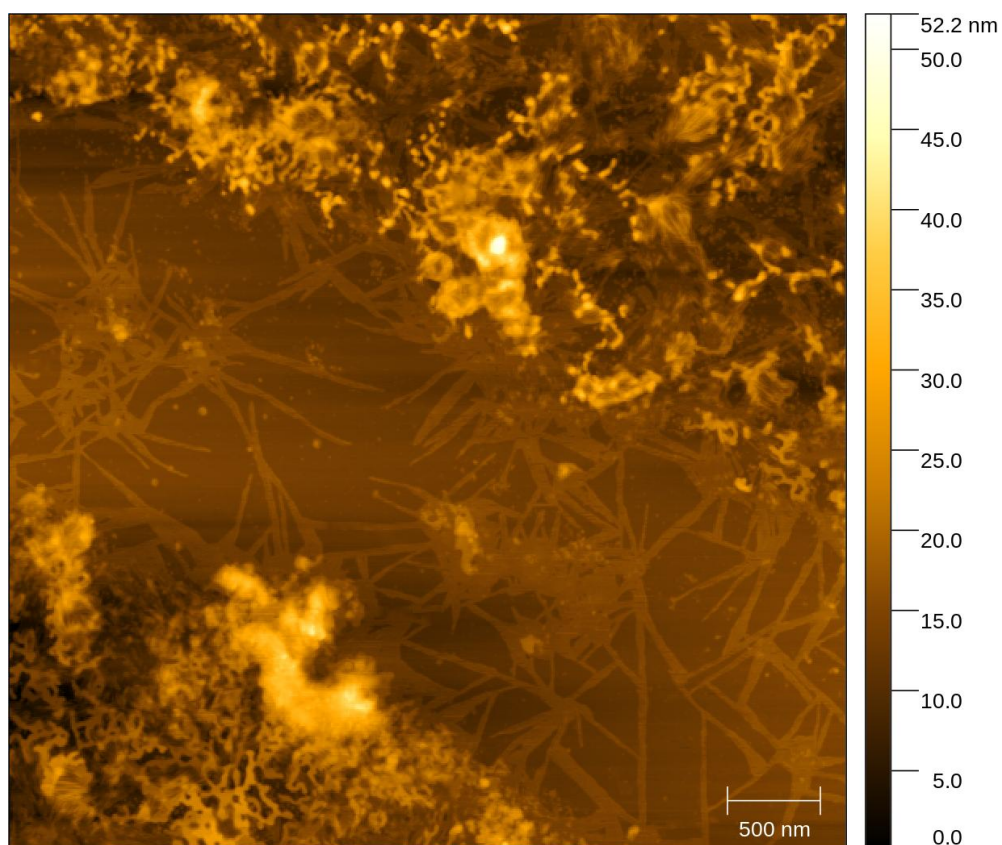
Natomiast w środowisku kwaśnym (pH 4), w obecności nanocząstek CuO, obserwuje się wyraźnie zmienioną morfologię HCC. Na części powierzchni dominują drobne, ziarniste struktury i skupiska przypominające agregaty nanocząstek (rysunek 82). W innych obszarach pojawiają się długie włóknikowate struktury tworzące nieregularne sieci (rysunki 84–85). W porównaniu z próbkami zawierającymi wyłącznie HCC w pH 4, układ ten jest bardziej heterogeniczny, a włókna wydają się mniej równoległe i nieregularnie rozmieszczone. Analiza profili wysokości odpowiadających strukturom widocznym na rysunkach 82 oraz 85 została przedstawiona odpowiednio na rysunkach 83 oraz 86–87.



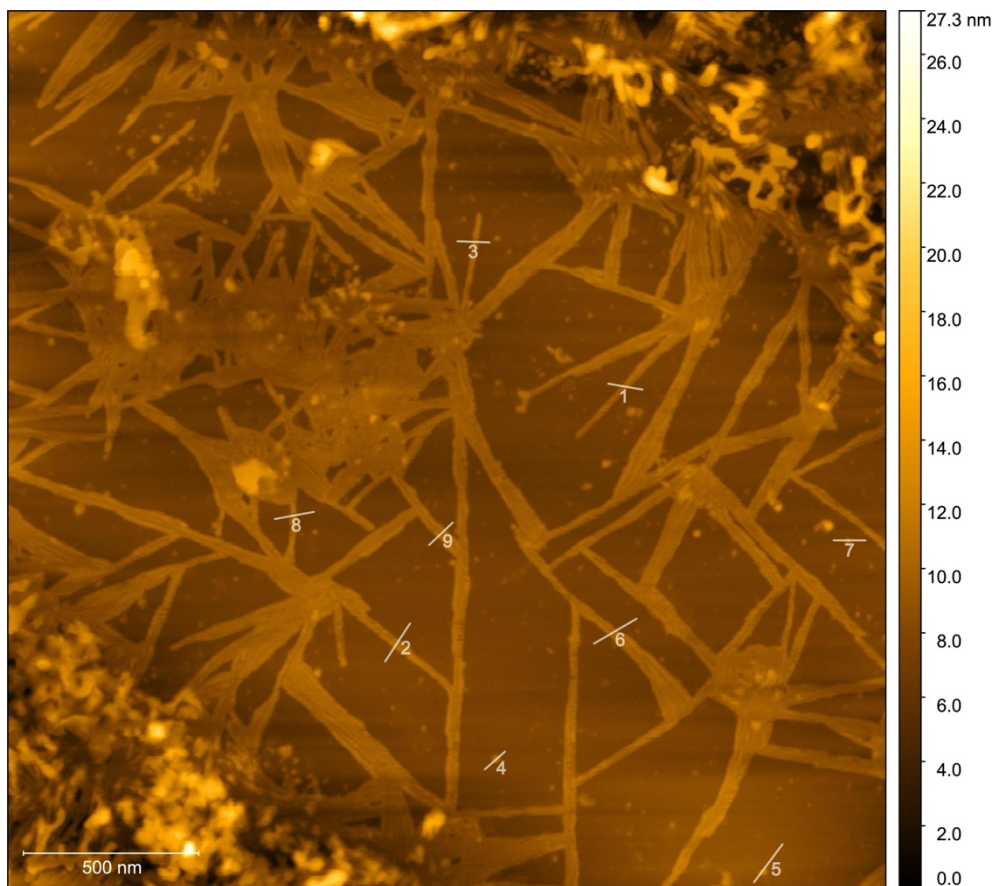
Rysunek 82. Obraz AFM próbki HCC w obecności CuO NPs w pH 4 po 8 godzinach przepływu. Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione na rysunku 83.



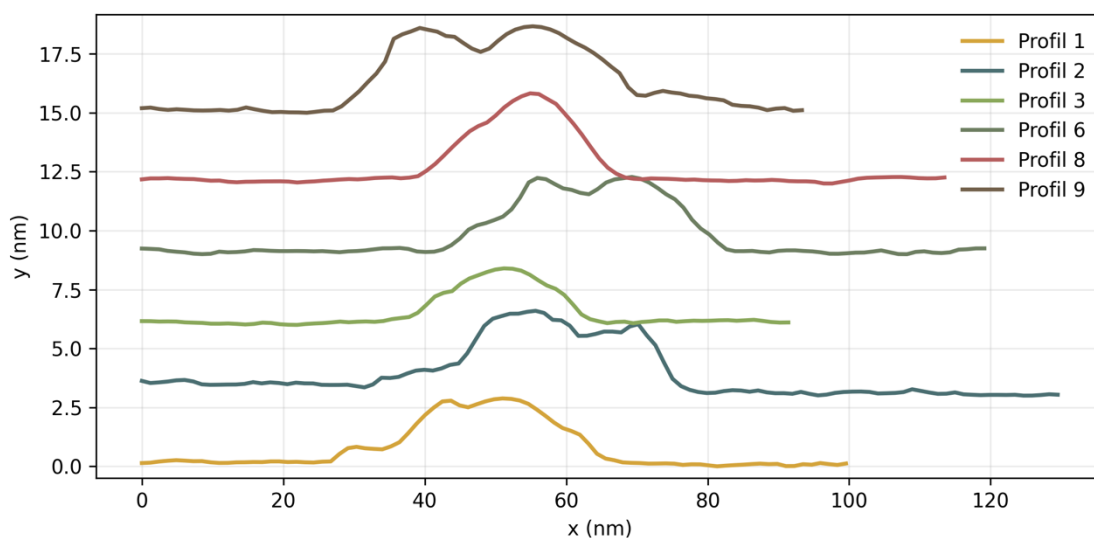
Rysunek 83. Zestawienie przykładowych profili wysokości obserwowanych struktur wyznaczonych na rysunku 82 dla próbek HCC inkubowanych z nanocząstkami CuO w pH 4 przez 8 h w przepływie mikrofluidycznym. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.



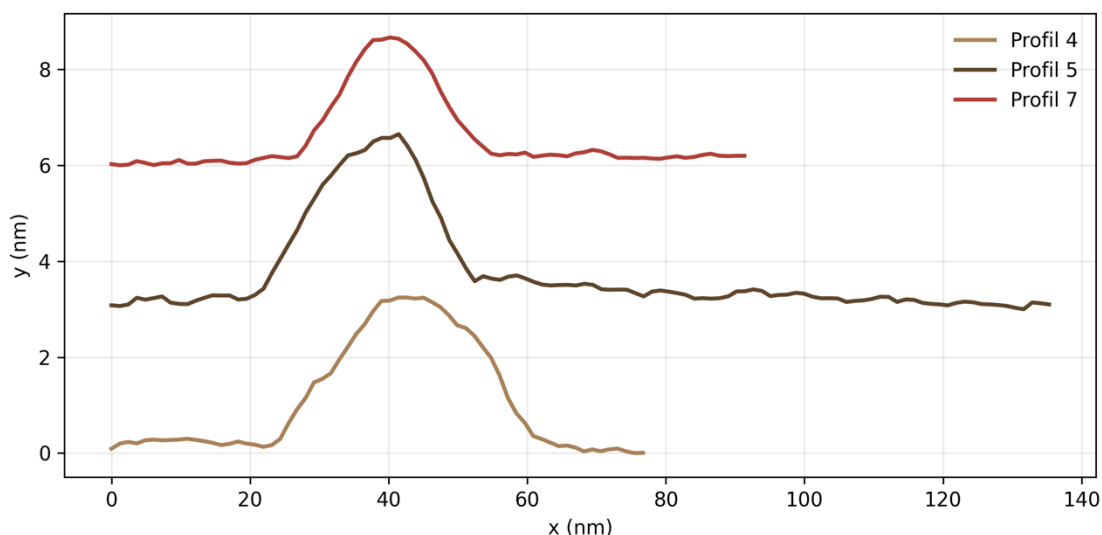
Rysunek 84. Obraz AFM próbki HCC w obecności CuO NPs w pH 4 po 8 godzinach przepływu.



Rysunek 85. Obraz AFM próbki HCC w obecności CuO NPs w pH 4 po 8 godzinach przepływu. Na obrazie przedstawiono profile wysokości zestawione dla struktur fibrylarnych (rysunek 86) oraz struktur sferycznych (rysunek 87).

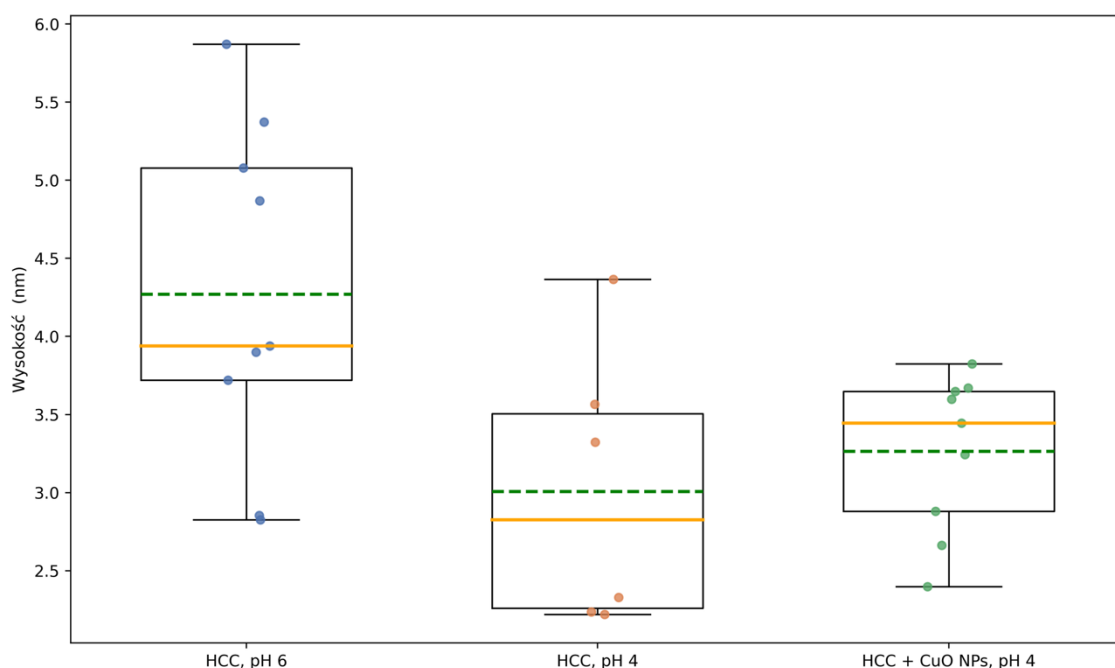


Rysunek 86. Zestawienie przykładowych profili wysokości wyznaczonych na rysunku 85 dla próbek HCC inkubowanych z nanocząstkami CuO w pH 4 przez 8 h w przepływie mikrofluidycznym. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.



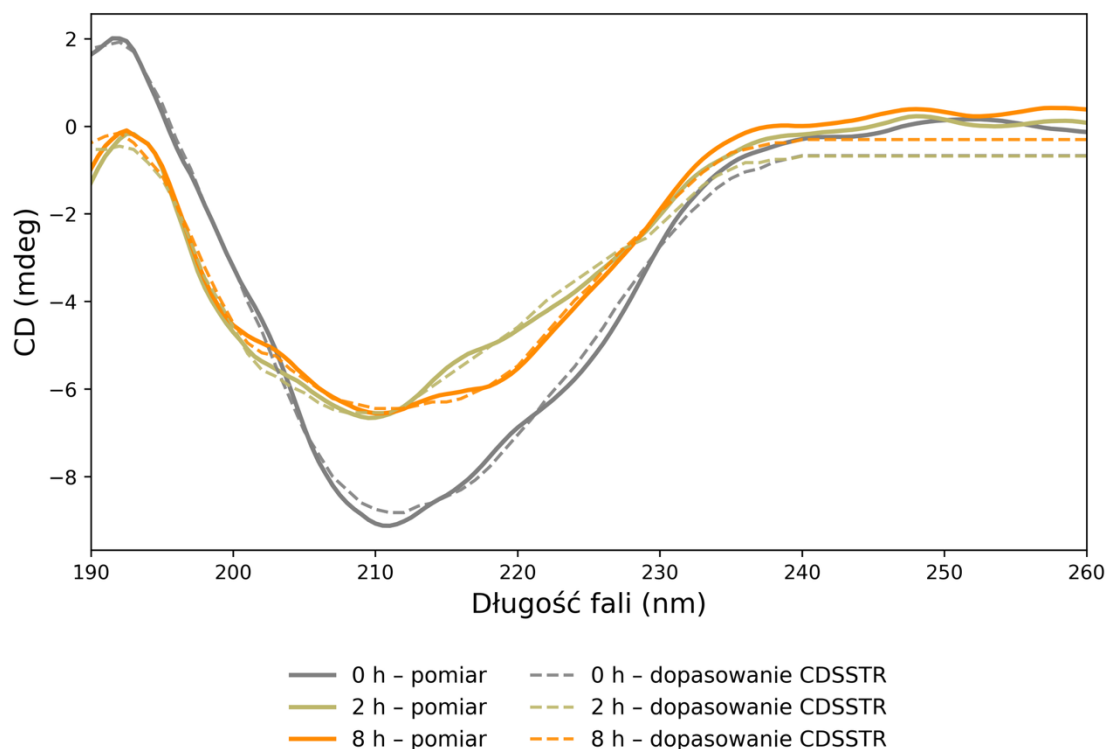
Rysunek 87. Zestawienie przykładowych profili wysokości wyznaczonych na rysunku 85 dla próbek HCC inkubowanych z nanocząstkami CuO w pH 4 przez 8 h w przepływie mikrofluidycznym. Profile zostały przesunięte względem siebie w osi pionowej w celu poprawy czytelności.

Aby ilościowo ocenić różnice pomiędzy strukturami obserwowanymi w poszczególnych warunkach, dokonano analizy wysokości, a wyniki przedstawiono na rysunku 88. Wartości wysokości struktur HCC różnią się pomiędzy badanymi warunkami. Mediana wysokości struktur w pH 6 wynosiła 3,9 nm, natomiast w pH 4 była niższa i osiągała wartość 2,8 nm. W obecności nanocząstek CuO w pH 4 zaobserwowano wzrost mediany wysokości do 3,5 nm. Otrzymane dane wskazują, że zarówno zmiana pH, jak i obecność CuO NPs modyfikują wysokość formowanych struktur HCC.



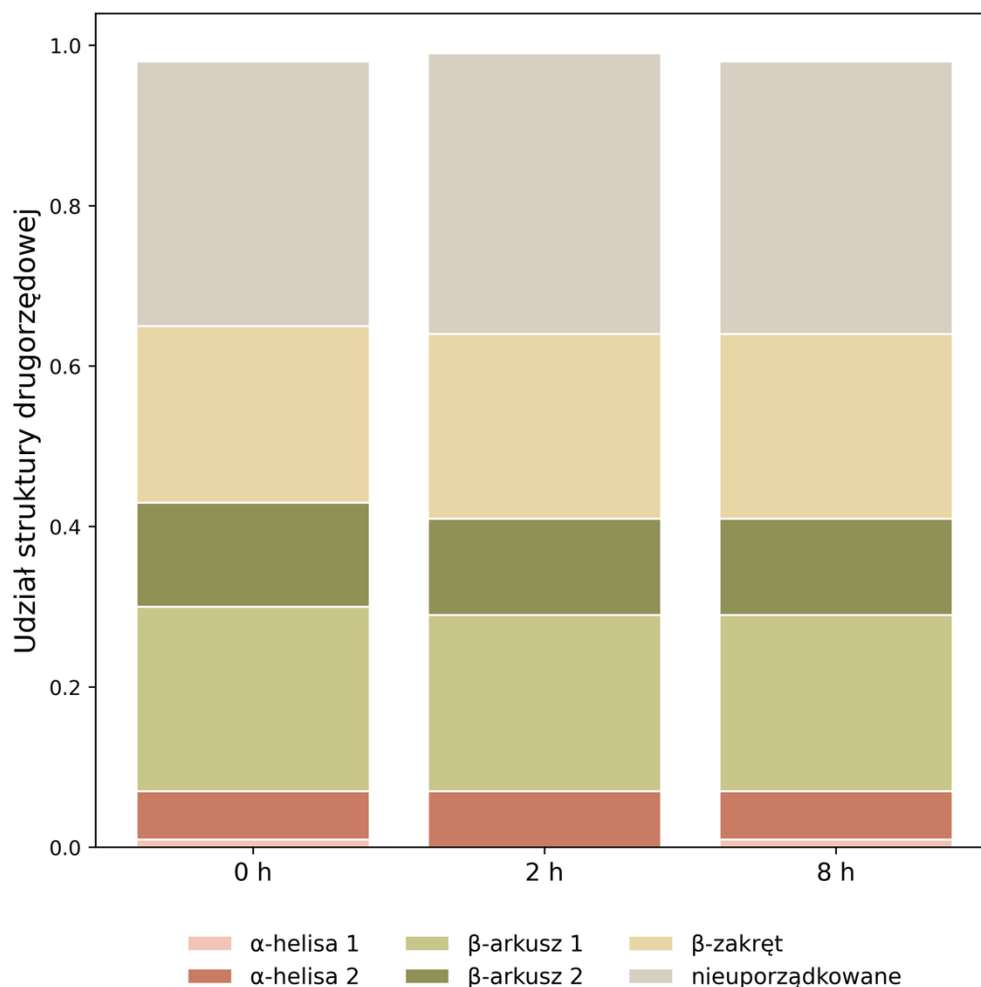
Rysunek 88. Porównanie wysokości struktur tworzonych przez białko HCC w różnych warunkach. Wykresy pudełkowe przedstawiają medianę (linia pomarańczowa), średnią (linia zielona przerywana), kwartyli oraz wartości indywidualne (punkty). Dane obejmują próbki HCC w pH 6, HCC w pH 4 oraz HCC inkubowane z nanocząstkami CuO NPs w pH 4.

Aby ocenić zmiany w strukturze drugorzędowej zachodzące w wyniku działania sił ścinających, próbki inkubowane w warunkach mikroprzepływowych w pH 4 poddano analizie metodą dichroizmu kołowego. Widma CD (rysunek 89) wykazują zmiany profilu sygnału pomiędzy próbką wyjściową (0 h), a próbkami po 2 i 8 godzinach cyrkulacji.



Rysunek 89. Widma dichroizmu kołowego (CD) dla HCC w pH 4 w różnych punktach czasowych podczas inkubacji w warunkach mikroprzepływowych.

Po 2 godzinach widoczne jest zmniejszenie intensywności minimum w zakresie 210-225 nm oraz niewielkie przesunięcie jego położenia, co sugeruje początek reorganizacji struktury drugorzędowej białka. W okresie od 2 do 8 godzin zmiany te ulegają dalszemu pogłębieniu - minimum staje się płytsze, a przebieg krzywej w zakresie 230-250 nm ulega modyfikacji, co odzwierciedla umiarkowane różnice w strukturze drugorzędowej, widoczne głównie w kształcie minimum i ogólnym profilu widma. Analiza zawartości struktur drugorzędowych przeprowadzona metodą CDSSTR (rysunek 90) potwierdziła, że obserwowane zmiany są ilościowo niewielkie. Udział struktur helikalnych ulega jedynie minimalnemu obniżeniu, natomiast sumaryczny udział struktur β ($\beta_1 + \beta_2$) pozostaje zbliżony pomiędzy wszystkimi punktami czasowymi. Również zawartość struktur nieuporządkowanych zmienia się jedynie w ograniczonym zakresie. Niskie wartości NRMSD (0,04–0,06) wskazują na dobrą jakość dopasowania i stabilność wyników.



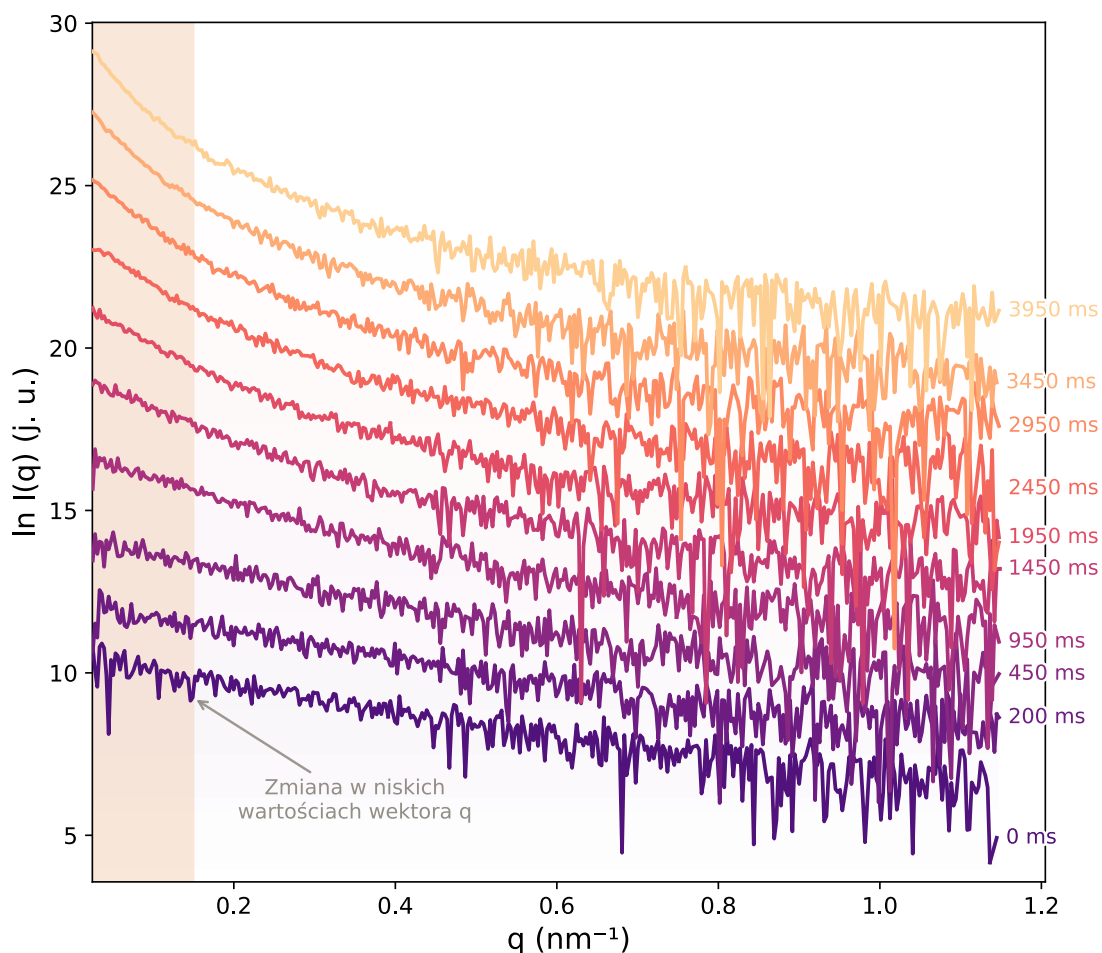
Rysunek 90. Udział struktur drugorzędowych w cząsteczce białka HCC w pH 4, wyznaczony metodą CDSSTR na podstawie widm dichroizmu kołowego (CD) dla próbek pobranych przed przepływem (0 h) oraz po 2 i 8 godzinach cyrkulacji w warunkach mikroprzepływowych.

Brak jednoznacznego, wyraźnego sygnału struktur β w widmach CD może wynikać z faktu, że technika ta rejestruje sygnał uśredniony z całej populacji cząsteczek, podczas gdy w strukturach amyloidowych uporządkowanie obejmuje przede wszystkim wąski rdzeń fibryli („cross- β core”)[255], a znaczna część pozostałych segmentów polipeptydowych pozostaje nieuporządkowana [256]. Proces agregacji potwierdzają natomiast obrazy AFM, które po 8 godzinach przepływu jednoznacznie wykazują obecność fibryli, mimo że ich formowanie nie jest wyraźnie odzwierciedlone w widmach CD.

6.4.5 Badania SAXS procesu agregacji HCC w przepływie mikrofluidycznym

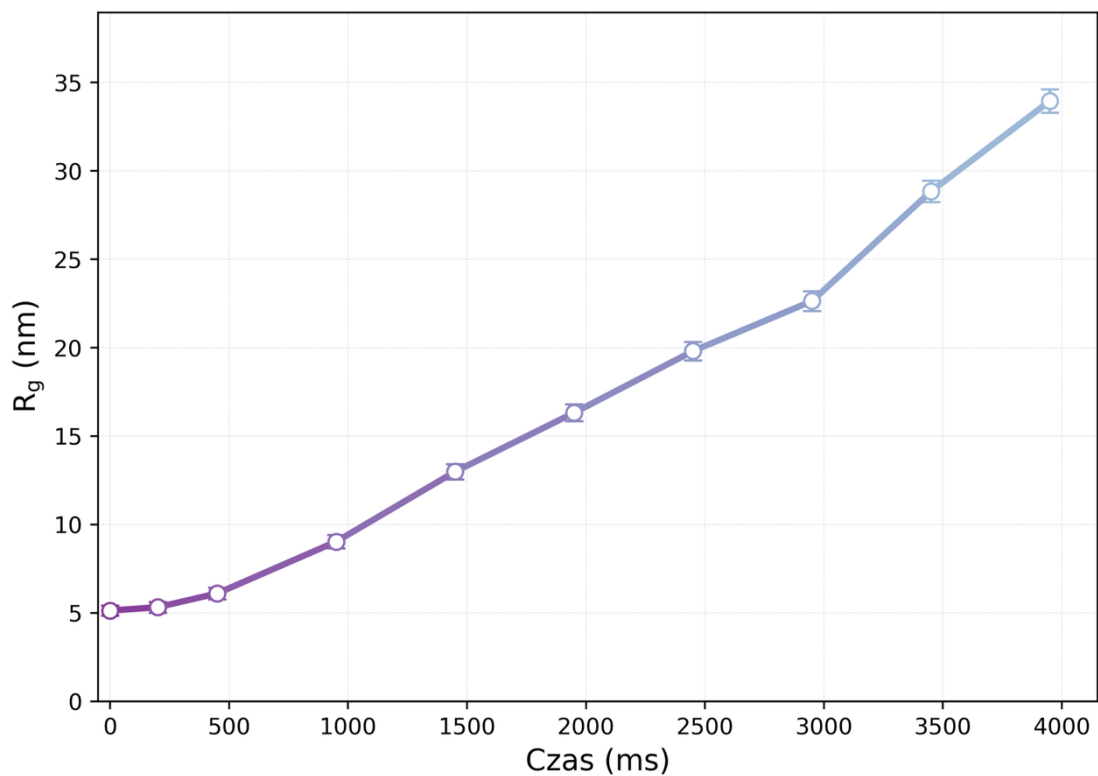
W celu oceny zmian rozmiaru i organizacji struktur powstających podczas inkubacji w warunkach mikroprzepływowych wykonano pomiary synchrotronowe SAXS dla próbek roztworów HCC oraz HCC w obecności nanocząstek CuO w pH 4. Porównano krzywe rozpraszania z różnych punktów czasowych z krzywą referencyjną białka przed przepływem. Pomiary wykonywano z czasem akwizycji 4 sekundy, a stężenie białka HCC wynosiło 3 mg/ml. Nanocząstki CuO wprowadzano w postaci supernatantu uzyskanego po odwirowaniu zawiesiny 1 mg/ml. Analizę krzywych SAXS, w tym dopasowania Guiniera oraz rekonstrukcję funkcji $p(r)$, przeprowadzono z wykorzystaniem pakietu ATSAS (EMBL Hamburg) [236] oraz narzędzi napisanych w języku programowania Python. Rekonstrukcję rozkładu odległości $p(r)$ wykonano w programie GNOM (ATSAS), który przetwarza dane $I(q)$ i na ich podstawie odtwarza wewnętrzny rozkład odległości w cząsteczce. Na tej podstawie obliczane są kluczowe parametry strukturalne: promień żyrcacji R_g , intensywność w punkcie zerowym $I(0)$, maksymalny rozmiar cząsteczki D_{max} oraz objętość Poroda. Parametr D_{max} odpowiada największemu wymiarowi badanego obiektu, przy którym funkcja $p(r)$ zanika - można go interpretować jako największą odległość występującą w obrębie cząsteczki lub agregatu. Z kolei objętość Poroda stanowi oszacowanie całkowitej wielkości badanego układu, wynikające z przebiegu krzywej rozpraszania.

W serii referencyjnej zaobserwowano systematyczną zmianę kształtu krzywej w kolejnych klatkach pomiarowych (rysunek 91). W początkowym czasie (0 ms) przebieg krzywej jest typowy dla cząsteczek występujących głównie w formie monomerów lub dimerów - sygnał w obszarze niskich kątów jest niski, a spadek intensywności ma regularny, charakterystyczny kształt. Wraz z upływem czasu (200–3950 ms) krzywe stopniowo zmieniają kształt: pojawia się charakterystyczne „podniesienie” sygnału w niskich wartościach wektora rozproszenia q oraz zwiększona nieregularność przebiegu. Zmiany te jednoznacznie wskazują na powstawanie większych cząstek rozproszonych, co odpowiada inicjacji procesów agregacji.

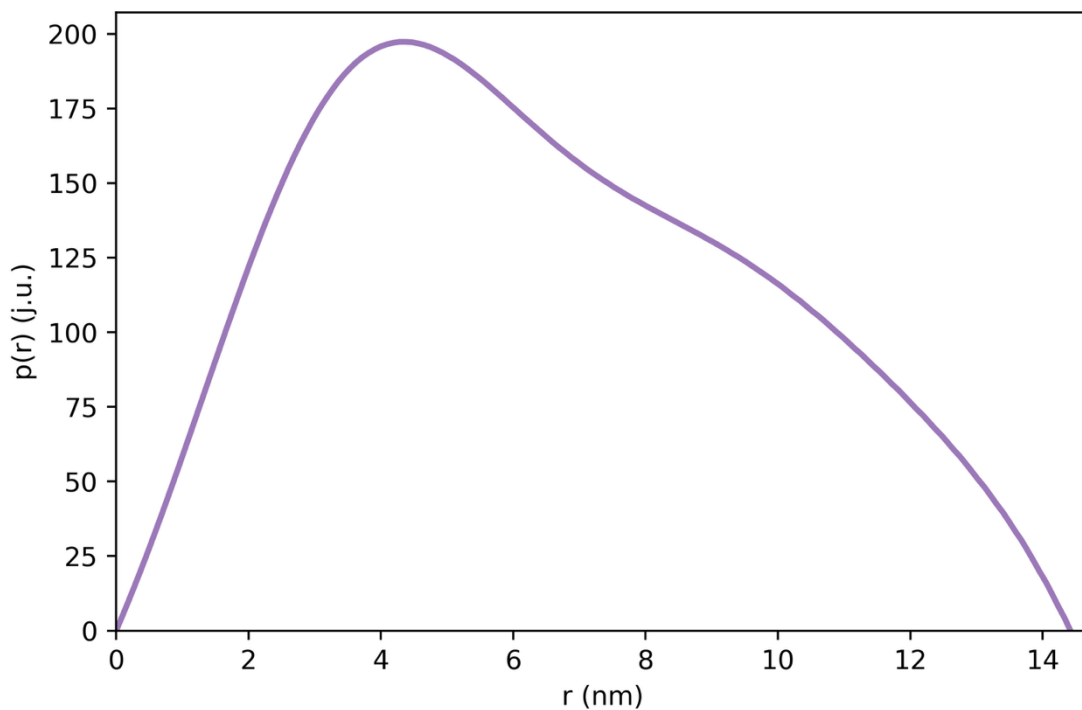


Rysunek 91. Przykładowe porównanie krzywych SAXS uzyskanych dla kolejnych, wybranych klatek serii referencyjnej HCC (pH 4). Widoczna zmiana kształtu w niskim q świadczy o efektach promieniowania synchrotronowego. Krzywe eksperymentalne zostały rozsunięte w celu lepszej reprezentacji obserwowanych zmian.

Podobne zjawisko opisano wcześniej dla HCC i wiąże się ono z indukcją procesu domain swapping pod wpływem promieniowania rentgenowskiego o wysokiej intensywności [165]. Zmiany te znajdują odzwierciedlenie we wzroście promienia żyracji R_g w czasie (rysunek 92), co potwierdza wpływ promieniowania synchrotronowego na strukturę białka i potencjalną reorganizację cząsteczek w trakcie pomiaru. Z tego powodu do dalszej analizy ilościowej wykorzystano jedynie początkowe, stabilne krzywe, pomijając dane z późniejszych etapów pomiaru, w których obserwowano zmiany charakterystyczne dla agregacji indukowanej promieniowaniem.



Rysunek 92. Zmiana wartości promienia żyracji R_g w funkcji czasu dla kolejnych punktów pomiarowych (frames) SAXS dla próbki referencyjnej HCC w pH 4. Wartości R_g podano wraz z niepewnością dopasowania ($\pm sR_g$).

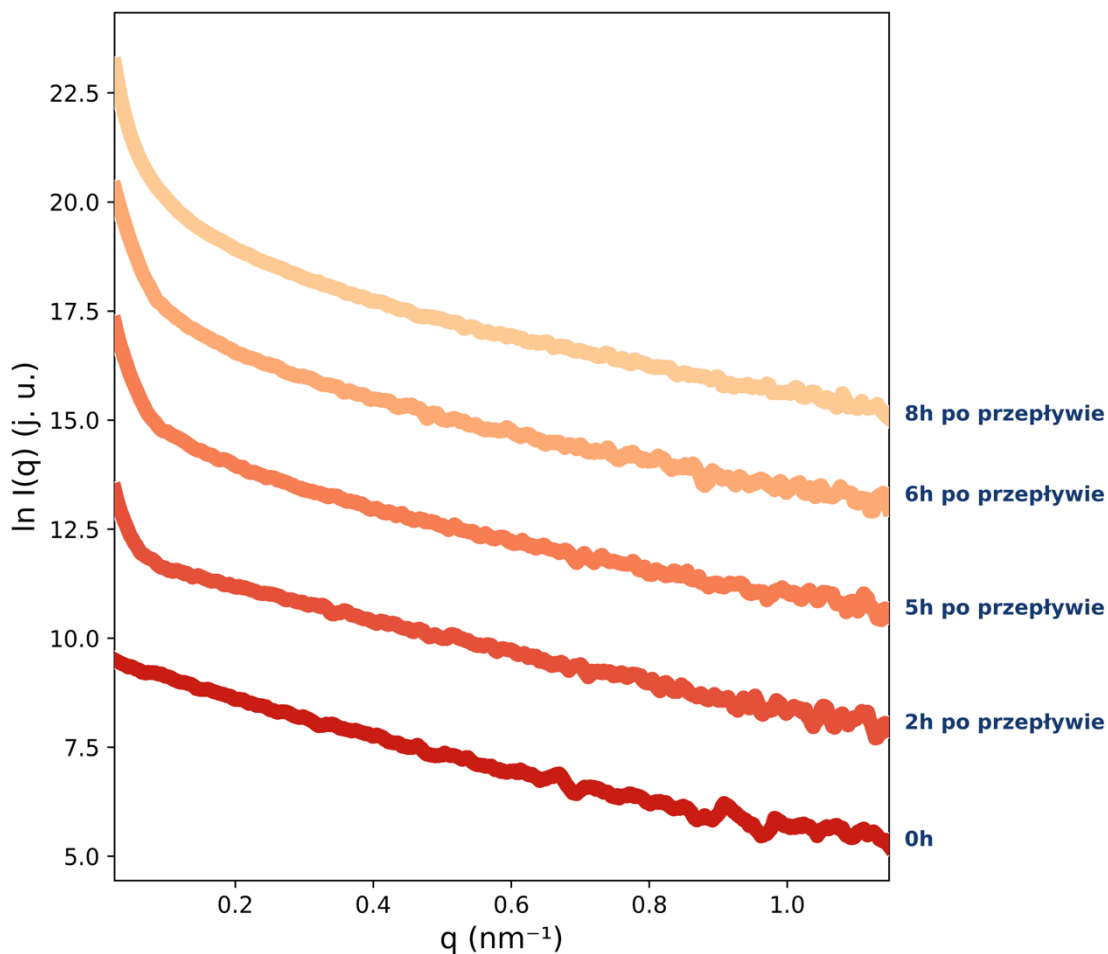


Rysunek 93. Funkcja rozkładu odległości $p(r)$ wyznaczona metodą GNOM dla próbki HCC w pH 4.

Dla próbki referencyjnej HCC (uśrednione 5 pierwszych klatek pomiarowych) przeprowadzono analizę dystrybucji odległości wewnątrzcząsteczkowej $p(r)$, na podstawie której wyznaczono promień żyracji R_g równy 5,1 nm. Kształt funkcji $p(r)$ (rysunek 93) wskazuje na obecność pojedynczej, zwartej populacji cząsteczek, co potwierdza jednorodność próbki. W tabeli 8 przedstawiono podstawowe parametry strukturalne próbki referencyjnej HCC, uzyskane z analizy Guiniera i rekonstrukcji funkcji $p(r)$. Otrzymane wartości R_g , $I(0)$, D_{max} oraz objętości Poroda opisują globalny rozmiar i ogólny charakter rozpraszania białka w warunkach wyjściowych pH 4. Parametry te stanowią punkt odniesienia dla dalszych analiz i umożliwiają ocenę zmian zachodzących w układach poddanych przepływowi oraz w obecności nanocząstek CuO. Wysoka wartość oceny jakości dopasowania ($\chi \approx 0,9$) wskazuje na bardzo dobrą zgodność danych eksperymentalnych z funkcją $p(r)$, potwierdzając wiarygodność wyznaczonych parametrów strukturalnych. Podwyższona wartość objętości Poroda sugeruje obecność niewielkiej populacji większych struktur, co odpowiada tendencji białka do tworzenia większych struktur w niskim pH [165] oraz dodatkowym efektem promieniowania synchrotronowego.

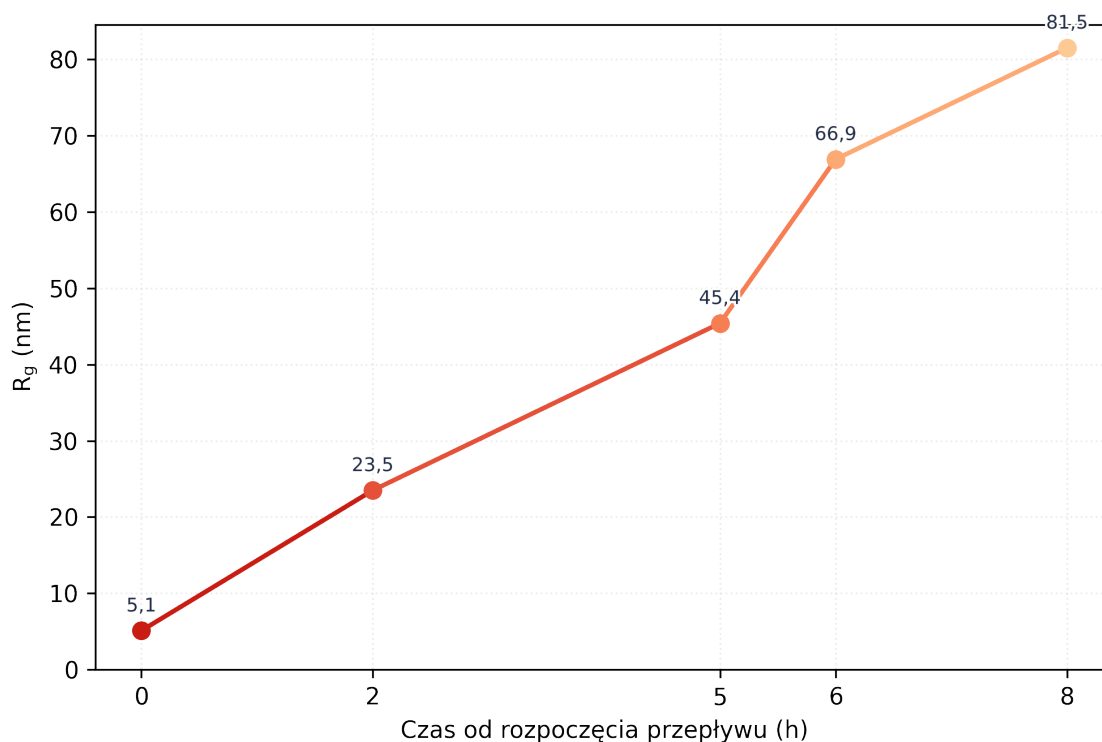
Tabela 8. Parametry strukturalne cząsteczki HCC otrzymane z analizy Guiniera oraz rekonstrukcji funkcji $p(r)$ metodą GNOM.

Parametr	Wartość
R_g Guinier [nm]	$6,85 \pm 1,04$
$I(0)$ Guinier [j.u.]	26425 ± 2550
R_g GNOM [nm]	5,10
$I(0)$ GNOM [j.u.]	21 000
D_{max} [nm]	14
Objętość Poroda [nm ³]	280 000
Współczynnik dopasowania	0,90



Rysunek 94. Porównanie krzywych SAXS uzyskanych dla próbek HCC w różnych odstępach czasu po przepływie (0 h – 8 h). Widoczny stopniowy wzrost intensywności w funkcji czasu, w zakresie niskich wartości wektora q .

Charakterystyka SAXS próbki referencyjnej dostarczyła informacji o strukturze białka w stanie wyjściowym i jest kluczowym punktem odniesienia do oceny wpływu przepływu mikrofluidycznego. Określone parametry wielkości i kształt krzywej rozpraszania pozwalają porównać próbkę referencyjną z układami badanymi w czasie inkubacji w mikrochipie. Krzywe SAXS (rysunek 94) z kolejnych punktów czasowych wskazują na stopniowy wzrost intensywności w niskich q , co jest cechą charakterystyczną pojawiania się w roztworze obiektów o zwiększonych rozmiarach. Aby ilościowo opisać tę tendencję, wyznaczono promień żyracji metodą Guiniera dla wszystkich próbek przepływowych (rysunek 95). Zgodnie z klasycznym założeniem Guiniera, liniowość wykresu $\ln(I)$ w funkcji q^2 wskazuje na obecność rozpraszającej populacji, której rozmiar mieści się w zakresie pomiarowym. Warto podkreślić, że warunek Guiniera ($q \cdot R_g < 1,3$) był dla próbek o dłuższym czasie przepływu spełniony jedynie w wąskim przedziale niskich q , co wynika z rosnącej polidispersyjności układu. Oznacza to, że uzyskane wartości R_g należy traktować jako parametr opisujący ogólny wzrost rozmiaru dominujących obiektów, a nie jako wielkość geometryczną pojedynczej cząsteczki. Mimo tego obserwowany w kolejnych próbkach niemal monotoniczny wzrost R_g stanowi jednoznaczne potwierdzenie postępującej agregacji białka w czasie przepływu.

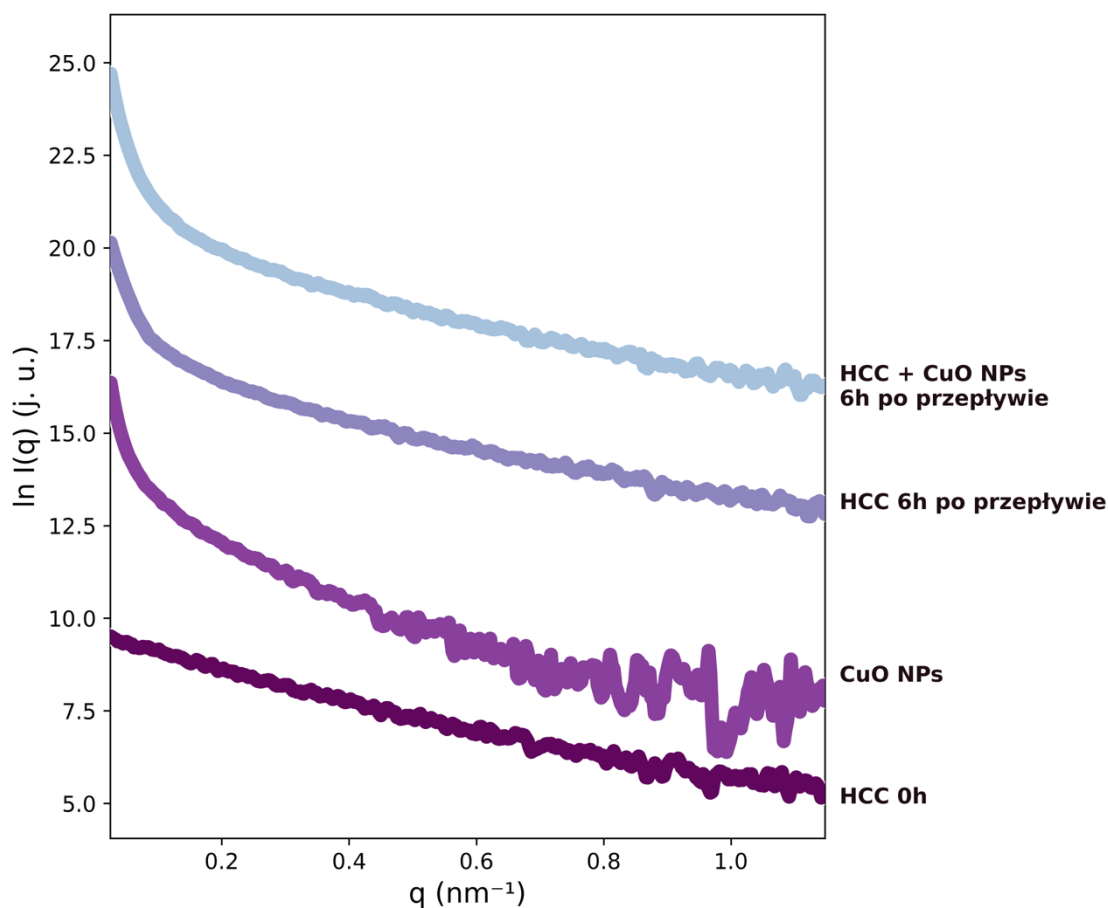


Rysunek 95. Zależność promienia żyracji R_g od czasu od rozpoczęcia przepływu (0–8 h) dla próbek HCC. W metodzie GNOM nie podaje się niepewności R_g , dlatego punkty przedstawiono bez słupków błędów.

Wyniki otrzymane w niniejszej pracy dobrze wpisują się również w szerszy kontekst badań nad wpływem mikroprzepływu na agregację białek. Gospodarczyk i Kozak [204] wykazali, że przepływ generujący lokalne siły ścinające prowadzi do gwałtownego przyspieszenia amyloidogenezy peptydu $A\beta_{1-42}$, a uzyskane krzywe SAXS charakteryzowały się stromym początkiem i obecnością dużych obiektów o rozmiarach niemożliwych do opisanego klasycznym modelem globularnym. Autorzy podkreślali, że analiza promienia żyracji w takich układach ma charakter przybliżony i odzwierciedla przede wszystkim polidispersję oraz rozwój niejednorodnych populacji agregatów, a nie obecność cząstek o precyzyjnie zdefiniowanym R_g . Podobną zależność obserwowano w przypadku HCC - wzrost R_g wyznaczony metodą GNOM stanowi przede wszystkim miarę ogólnego postępu organizacji w większe struktury, a nie wskazuje na powstawanie pojedynczych agregatów o jednoznacznym geometrycznym rozmiarze. Jest to szczególnie istotne w warunkach mikroprzepływu, w których mogą tworzyć się złożone, amorficzne struktury o szerokim rozkładzie masy i kształtów. W badanych próbkach HCC szczególnie wyraźny jest silny wzrost R_g , który już po 6 godzinach osiąga wartości typowe dla dużych agregatów lub prekursorów włóknistych struktur białkowych. R_g wyznaczony metodą GNOM dla próbek przepływowych wykazuje spójność ze wzrostem intensywności krzywych SAXS i dobrze odzwierciedla postępującą reorganizację cząsteczek. Wartości te wskazują, że zachodzące procesy nie ograniczają się do tworzenia oligomerów o niewielkiej liczbie jednostek, lecz prowadzą do powstawania obszernych agregatów, co odróżnia mechanizm przepływowy od agregacji inicjowanej jedynie niskim pH lub promieniowaniem rentgenowskim. W przeciwieństwie jednak do peptydu $A\beta_{1-42}$, w przypadku HCC obserwowany przyrost R_g jest wyraźnie monotoniczny, co

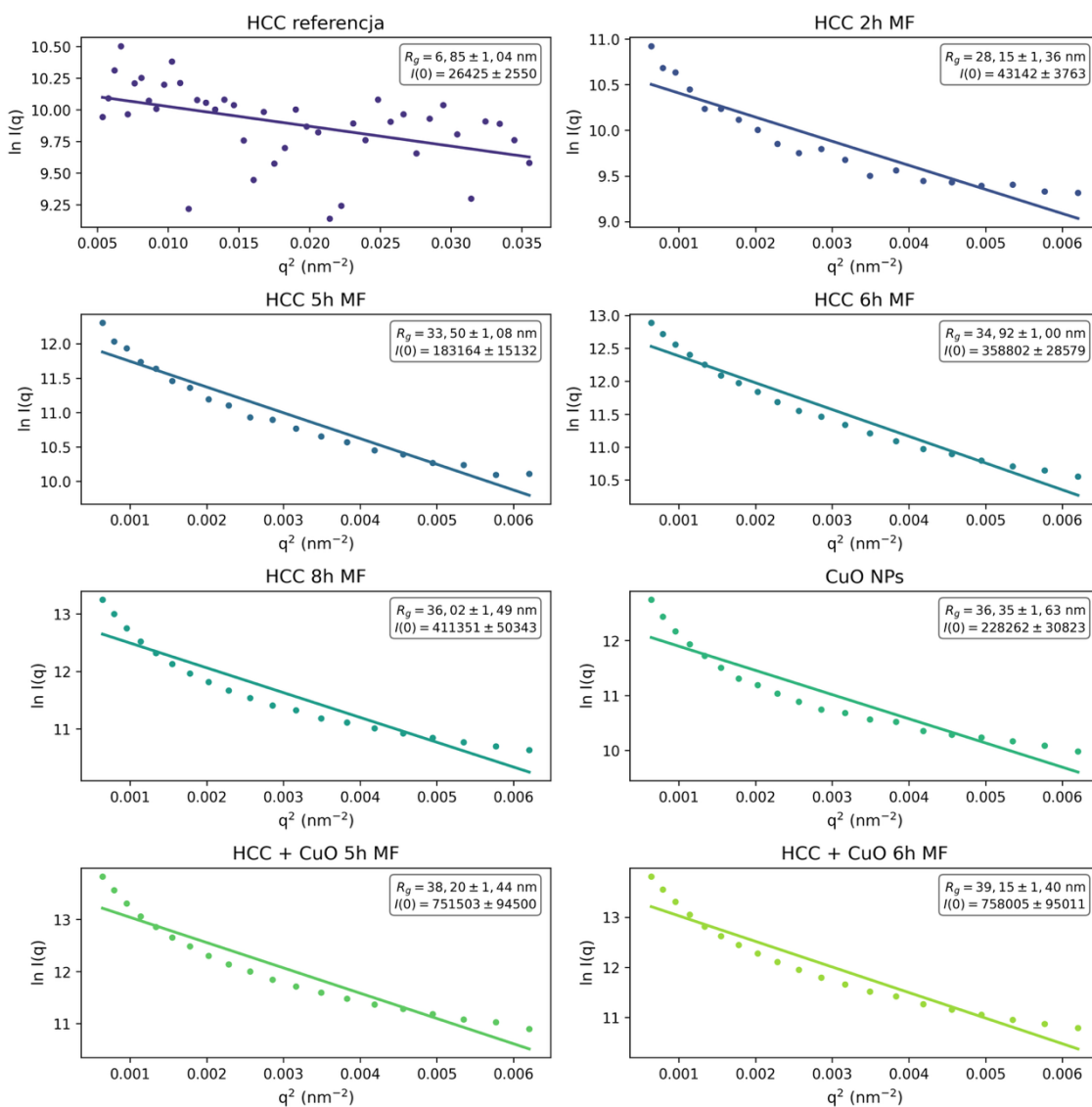
sugeruje bardziej uporządkowany przebieg agregacji i brak tendencji do późniejszego rozpadu struktur. Wyniki sugerują, że mikroprzepływ istotnie przyczynia się do inicjowania i stabilizacji większych agregatów białkowych.

Dodatkowym elementem analizy SAXS była charakterystyka syntetyzowanych nanocząstek CuO oraz ocena ich wpływu na przebieg agregacji HCC w warunkach mikroprzepływowych. Krzywa SAXS zarejestrowana dla samych nanocząstek CuO wykazuje wysoki poziom intensywności w niskich wartościach wektora q oraz brak wyraźnych cech strukturalnych, co wskazuje na polidispersyjną populację nieregularnych agregatów metalicznych. Następnie porównano krzywe SAXS próbek HCC 6 godzinach inkubacji w przepływie - zarówno dla czystego białka, jak i układów zawierających nanocząstki CuO. Intensywności krzywych SAXS w obecności CuO NPs były wyraźnie podwyższone w stosunku do próbek HCC poddanych przepływowi bez dodatku nanocząstek (rysunek 96).



Rysunek 96. Porównanie krzywych SAXS dla próbek HCC przed i po przepływie (6h), CuO NPs oraz układu HCC–CuO NPs po 6h przepływu.

Zestawienie tych wyników jednoznacznie wskazuje, że CuO NPs istotnie modulują proces agregacji HCC w przepływie. Nanocząstki mogą pełnić rolę zarówno nukleatorów przyspieszających inicjację agregacji, jak i powierzchni adsorpcyjnych stabilizujących tworzące się struktury białkowe. W efekcie obserwowane zmiany kształtu krzywych SAXS odzwierciedlają sumaryczne działanie dwóch procesów: naturalnej agregacji wywołanej przepływem oraz dodatkowej reorganizacji wynikającej z oddziaływania białka z powierzchnią CuO NPs.



Rysunek 97. Analiza Guiniera dla próbek HCC, CuO NPs oraz układów HCC + CuO NPs. Na podstawie liniowego zakresu wykresów Guiniera wyznaczono wartości promieni R_g oraz intensywności $I(0)$.

W celu uzupełnienia analizy SAXS dla próbek poddanych przepływowi mikrofluidycznemu wyznaczono promień żyracji R_g metodą Guiniera dla wszystkich badanych układów: HCC przed i po przepływie, syntetyzowanych nanocząstek CuO oraz mieszanin HCC + CuO NPs po 5 i 6 godzinach przepływu (rysunek 97). Dla próbki referencyjnej HCC uzyskano liniowy fragment krzywej Guiniera, co potwierdza

obecność zwartej, globularnej populacji cząsteczek w roztworze. Wyznaczony promień żyracji (ok. 6,8 nm) jest spójny z wynikami analizy GNOM oraz charakterystycznym kształtem funkcji $p(r)$.

W próbkach HCC poddanych przepływowi (2–8 h) obserwowany jest systematyczny wzrost nachylenia prostych Guiniera, co przekłada się na stopniowy wzrost obliczanego R_g . Jest to zgodne z wcześniejszą analizą krzywych SAXS i świadczy o narastającej agregacji. Należy jednak podkreślić, że dla próbek o długim czasie przepływu zakres, w którym spełniony jest warunek Guiniera, ulega znacznemu zawężeniu. Zwiększona krzywizna i odchylenia od liniowości wskazują, że układ nie jest jednorodny, a rozrastające się agregaty przyczyniają się do zaburzeń w obszarze niskich q . Z tego względu wartości R_g dla tych próbek należy rozumieć nie jako ścisły parametr geometryczny, lecz raczej jako miarę ogólnego wzrostu rozmiaru dominujących struktur.

W przypadku syntetyzowanych nanocząstek CuO analiza Guiniera również ujawnia jedynie pozorną liniowość, wynikającą z faktu, że układ jest silnie polidispersyjny. Wartość R_g obliczona dla CuO NPs (ok. 36 nm) nie opisuje więc fizycznego promienia pojedynczej nanocząstki, lecz odzwierciedla średnią wielkość dominujących agregatów obecnych w roztworze.

Największe wartości R_g uzyskano dla układów mieszanych HCC + CuO NPs po 5 i 6 godzinach przepływu, Zwiększone nachylenie krzywych Guiniera wskazuje, że w tych próbkach tworzą się duże, stabilne agregaty. W połączeniu z obserwowanym w krzywych SAXS wzrostem intensywności w niskich wartościach q , świadczy to o powstawaniu agregatów o złożonej morfologii, w których CuO NPs mogą ułatwiać wzrost agregatów białkowych.

Podsumowanie wyników analizy SAXS dla wszystkich badanych próbek przedstawiono w tabeli 9, obejmującej wartości promienia żyracji R_g (wyznaczonego metodami Guiniera i GNOM), intensywność $I(0)$, maksymalny wymiar cząsteczki D_{max} oraz objętość Poroda. Zestawienie to umożliwia bezpośrednie porównanie zmian zachodzących w próbkach HCC podczas inkubacji przepływowej oraz w układach zawierających również nanocząstki CuO. Zarówno R_g , jak i $I(0)$ wykazują wyraźny wzrost wraz z czasem przepływu, co wskazuje na stopniowe powiększanie się dominujących obiektów rozpraszających. Parametry D_{max} i objętości Poroda również rosną w czasie, co świadczy o formowaniu coraz większych i bardziej rozbudowanych agregatów białkowych.

Tabela 9. Tabela. Parametry uzyskane z analizy Guiniera i GNOM dla próbek HCC (0–8 h), CuO NPs oraz próbek mieszaniny HCC + CuO.

Parametr	HCC 0h (referencja)	HCC 2h MF	HCC 5h MF	HCC 6h MF	HCC 8h MF	CuO NPs	HCC + CuO NPs 5h MF	HCC + CuO NPs 6h MF
R_g Guinier [nm]	6,9 ± 1,0	28,1 ± 1,4	33,5 ± 1,1	34,9 ± 1,0	36,0 ± 1,5	36,4 ± 1,6	38,2 ± 1,4	39,2 ± 1,4
$I(0)$ Guinier [j.u.]	26 425 ± 2 550	43 142 ± 3 763	183 164 ± 15 132	358 802 ± 28 579	411 351 ± 50 343	228 262 ± 30 823	751 503 ± 94 500	758 005 ± 95 011
Współczynnik dopasowania Guiniera (R^2)	0,21	0,86	0,93	0,94	0,89	0,87	0,91	0,92
R_g GNOM [nm]	5,1	23,5	45,4	66,9	81,5	81,3	75,6	76,3
$I(0)$ GNOM [j.u.]	21 460	25 000	250 000	930 000	2 100 000	260 000	180 000	280 000
D_{max} [nm]	14	82	130	220	260	236	220	220
Objętość Poroda [nm ³]	290 000	4 500	290 000	770 000	1 800 000	2 005 000	1 500 000	1 600 000
Współczynnik dopasowania GNOM	0,90	0,65	0,91	0,90	0,97	0,96	0,95	0,94

Podsumowując, analiza Guiniera - pomimo ograniczeń wynikających z rosnącej polidispersji układów - jednoznacznie wskazuje na systematyczny wzrost promienia żyrcji we wszystkich próbkach poddanych przepływowi. Wartości R_g zwiększają się wraz z czasem inkubacji, co odzwierciedla stopniowe powiększanie się dominujących obiektów rozpraszających. W próbkach zawierających nanocząstki CuO wzrost ten jest jeszcze bardziej wyraźny, co sugeruje, że obecność CuO sprzyja intensyfikacji procesu agregacji białka. Łączna analiza parametrów zestawionych w tabeli 9 - obejmująca wyniki uzyskane metodą Guiniera, rekonstrukcję funkcji $p(r)$ w programie GNOM oraz ocenę pełnych krzywych SAXS - prowadzi do spójnego wniosku, że przepływ mikrofluidyczny oraz obecność nanocząstek CuO działają synergistycznie, zwiększając rozmiar i złożoność powstających struktur białkowych.

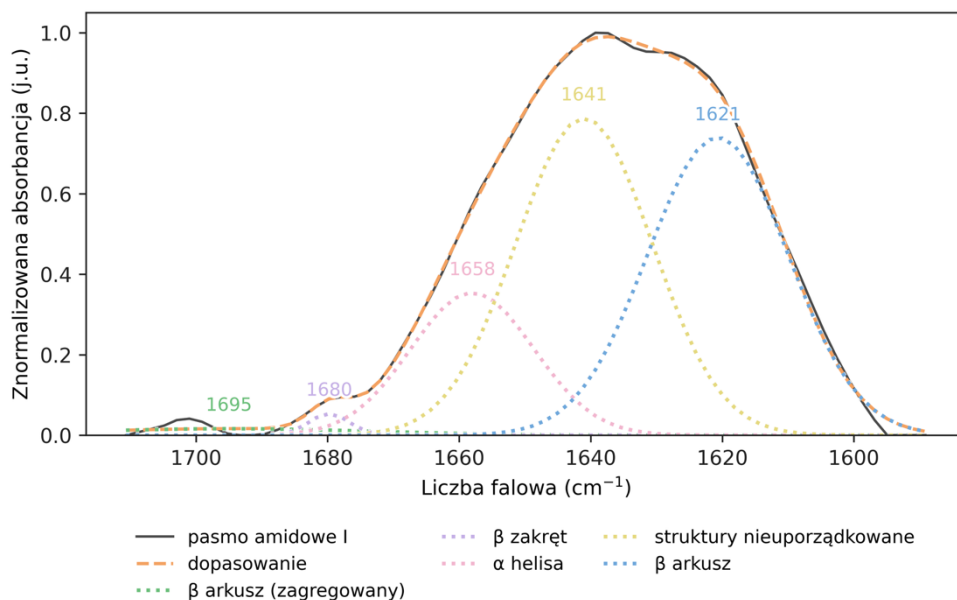
6.4.6 Badanie procesów agregacji HCC metodą połączonej spektroskopii FTIR i AFM

W celu ustalenia, czy obserwowane w pomiarach SAXS zmiany wielkości cząsteczek HCC wynikają wyłącznie z narastania stopnia agregacji, czy też towarzyszą im modyfikacje struktury drugorzędowej białka, zastosowano uzupełniające techniki w podczerwieni - ATR-FTIR oraz nanospektroskopię IR (nanoIR). Metody te zostały wybrane ze względu na ich komplementarne zalety: klasyczne ATR-FTIR pozwala na analizę średniego składu strukturalnego całej próbki, natomiast nanoIR umożliwia badanie zmian struktury wtórnej z rozdzielczością nanometryczną, co jest kluczowe przy heterogennych agregatach powstających w przepływie.

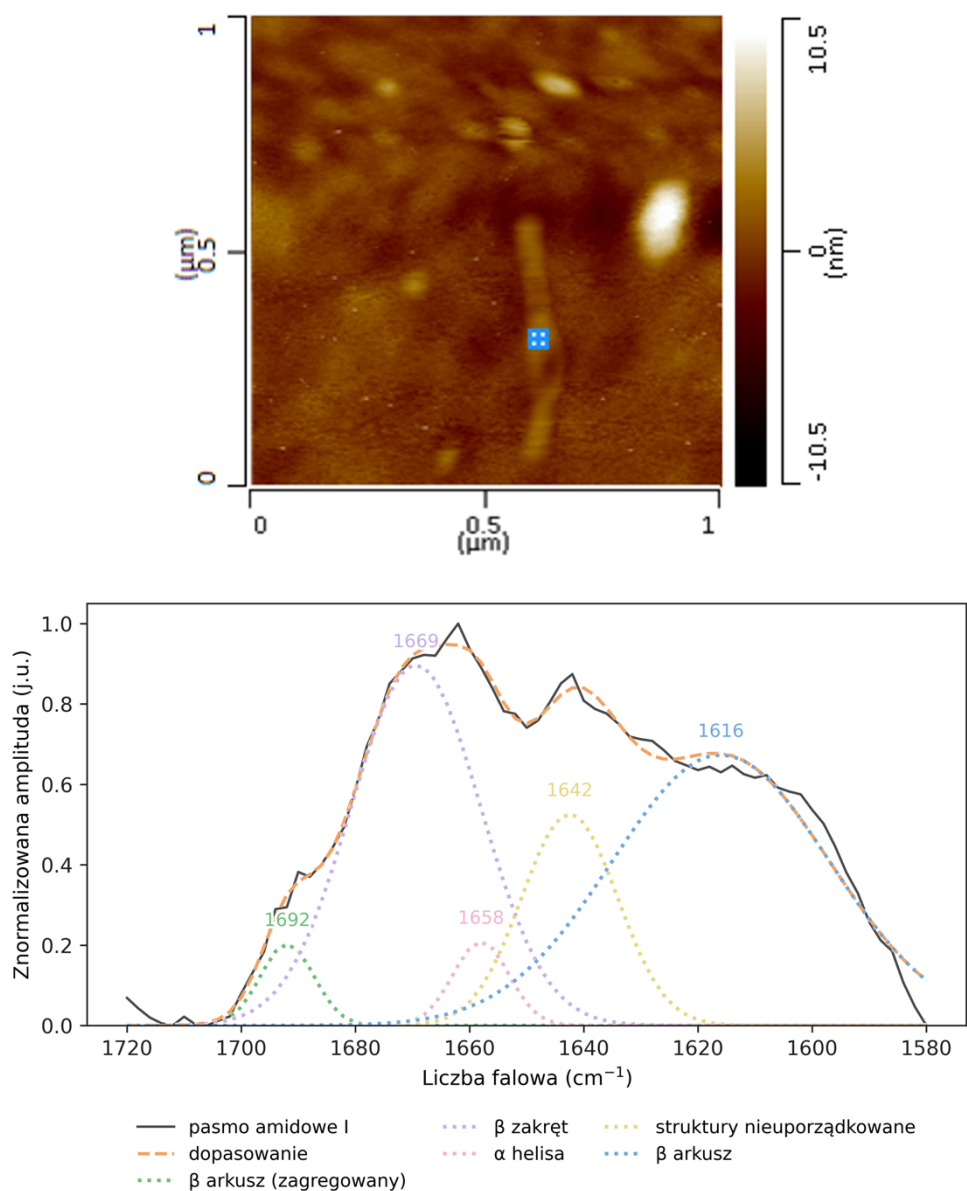
Zastosowanie metod IR było konieczne, ponieważ dane SAXS, choć dostarczają informacji o wielkości i ogólnej organizacji agregatów, nie pozwalają jednoznacznie określić, czy wzrost R_g i intensywności w niskich q wynika z luźnej aglomeracji cząsteczek, czy też z powstawania struktur o zwiększonym udziale β -arkuszy, typowych dla agregacji amyloidowej. Dopiero analiza pasma amidowego I umożliwia rozróżnienie tych procesów i ocenę, czy obserwowane zmiany mają charakter konformacyjny, czy wyłącznie przestrzenny. W analizie IR porównano próbkę HCC inkubowaną przez 6 dni w pH 4 na czytniku płytek (700 rpm) z próbką HCC inkubowaną przez 8 godzin w warunkach mikroprzepływu w tym samym pH, aby ocenić, w jaki sposób przepływ wpływa na zmiany struktury drugorzędowej białka.

Widmo ATR-FTIR próbki HCC inkubowanej przez 6 dni w pH 4 (rysunek 98) wykazuje wyraźne maksimum pasma amidowego I w zakresie niższych liczb falowych, co wskazuje na zwiększony udział struktur β . Dekonwolucja widma potwierdziła dominację tych struktur (~44,5%) oraz równoczesny spadek zawartości α -helisy (~26%), co jednoznacznie sugeruje przebudowę struktury wtórnej białka w kierunku bardziej uporządkowanych układów β -arkuszkowych.

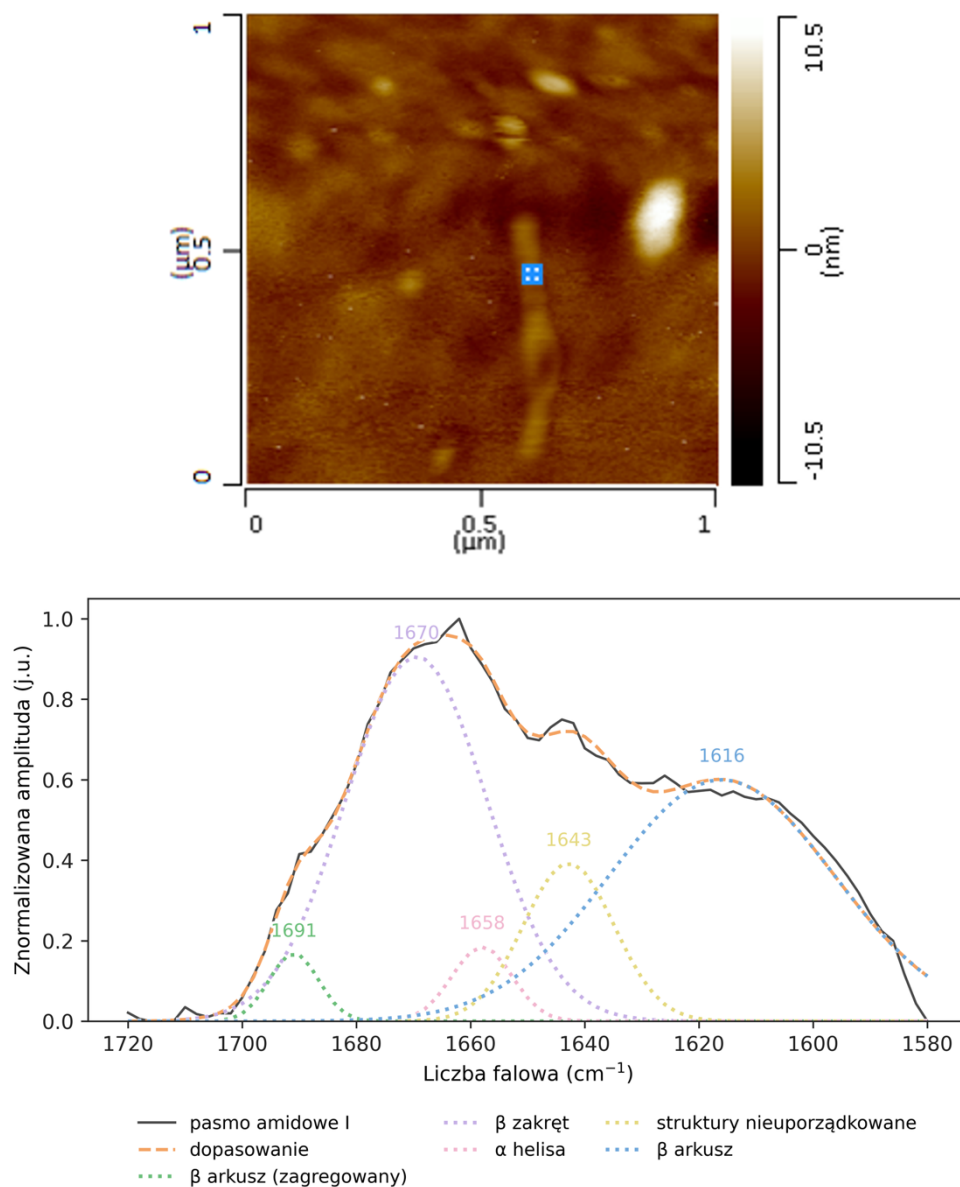
Aby zweryfikować, czy strukturalne zmiany są homogenicznie rozmieszczone w agregacie, wykorzystano nanospektroskopię IR (nanoIR), która umożliwia rejestrację lokalnych widm dla wybranych miejsc próbki z rozdzielczością poniżej 100 nm. Uzyskane widma (rysunki 99–100) potwierdzają obecność β -struktur, jednak proporcje pomiędzy β -arkuszem, β -zakrętem oraz strukturami nieuporządkowanymi różnią się w zależności od badanego obszaru. Świadczy to o heterogenicznym charakterze agregatów, w których obszary bardziej uporządkowane współistnieją z regionami mniej ustrukturyzowanymi. Zjawisko to jest typowe dla agregacji postępującej etapowo i wskazuje na lokalne różnice w dynamice nukleacji oraz dojrzewania włóknistych form białkowych.



Rysunek 98. Widmo ATR-FTIR oraz dekonwolucja pasma amidowego I (1720–1580 cm^{-1}) dla próbki HCC inkubowanej przez 6 dni w pH 4. Linia czarna - widmo eksperymentalne, linia pomarańczowa - dopasowanie modelu, linie przerywane - komponenty Gaussa.



Rysunek 99. Obraz nanoIR próbki HCC inkubowanej przez 6 dni w pH 4 (góra). Zaznaczony obszar wskazuje miejsce pomiaru widma nanoIR przedstawionego w dolnej części. Widmo nanoIR oraz dekonwolucja pasma amidowego I (1720–1580 cm⁻¹) dla tej samej próbki (dół). Linia czarna - widmo eksperymentalne, linia pomarańczowa - dopasowanie modelu, linie przerywane - komponenty Gaussa.

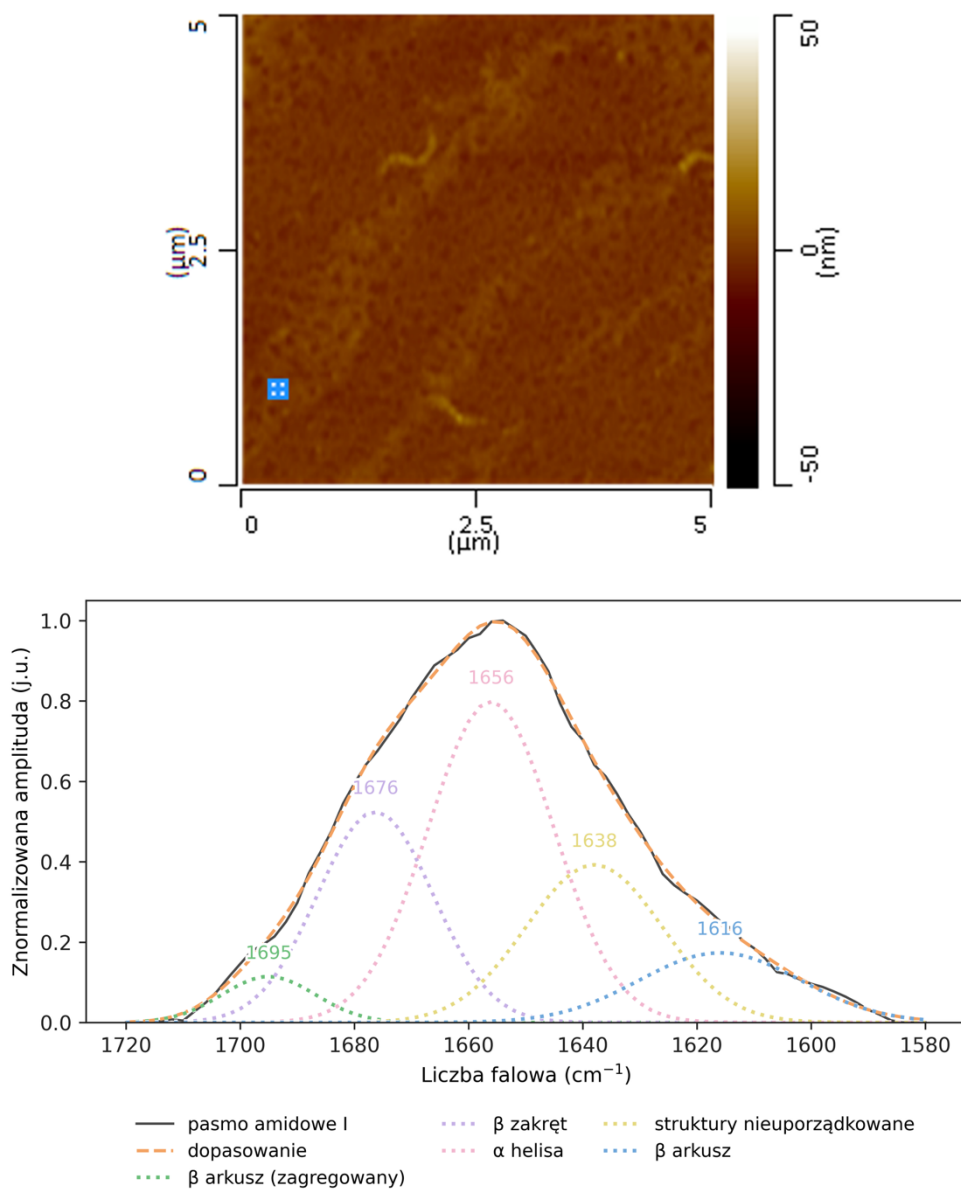


Rysunek 100. Obraz nanoIR próbki HCC inkubowanej przez 6 dni w pH 4 (górną). Zaznaczony obszar wskazuje miejsce pomiaru widma nanoIR przedstawionego w dolnej części. Widmo nanoIR oraz dekonwolucja pasma amidowego I (1720–1580 cm^{-1}) dla tej samej próbki (dół). Linia czarna - widmo eksperymentalne, linia pomarańczowa - dopasowanie modelu, linie przerywane - komponenty Gaussa.

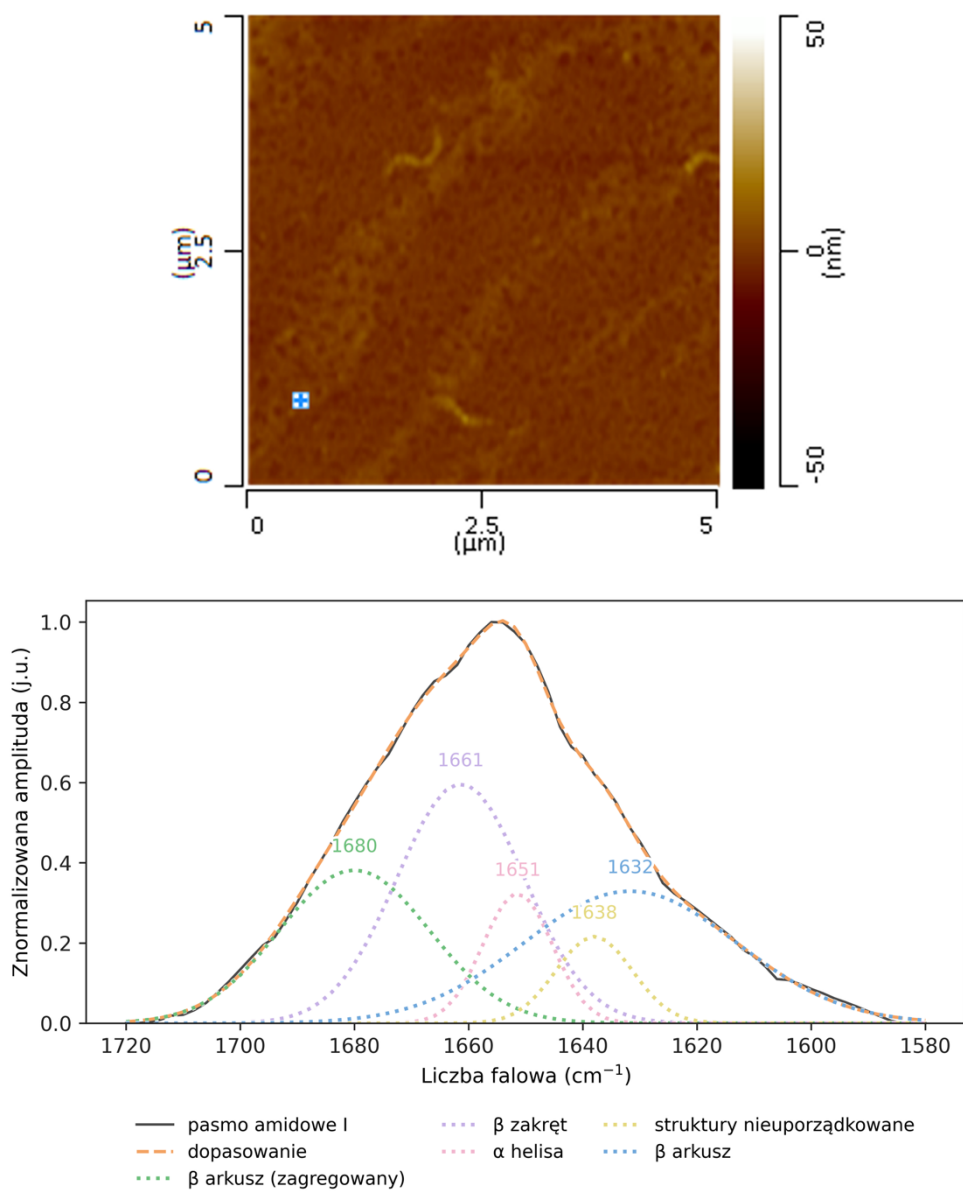
Z wykorzystaniem tej samej metody przeanalizowałam również próbki HCC inkubowane przez 8 godzin w warunkach mikroprzepływu (rysunki 101-102), aby ocenić, w jaki sposób przepływ wpływa na lokalną organizację struktury drugorzędowej białka. Uzyskane widma wykazały wyraźnie większą zmienność sygnału w obrębie pojedynczej próbki niż obserwowano w materiale inkubowanym w warunkach wytrząsania. W poszczególnych punktach pomiarowych rejestrowano istotnie odmienne proporcje struktur wtórnych: w jednym obszarze dominowały pasma charakterystyczne dla struktur β (~52,5%), natomiast w innym udział struktur β był znacznie niższy (~15%), przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości struktur α -helikalnych (~40%). Tak duża rozpiętość wartości wskazuje, że agregaty formujące się w przepływie mają wysoce niejednorodny charakter i składają się z domen o różnym stopniu uporządkowania.

Kontrastuje to z próbkami inkubowanymi przez 6 dni, w których zawartość struktur β była względnie jednorodna w całej objętości materiału (44–46%). Zdecydowanie większe zróżnicowanie próbek mikroprzepływowych sugeruje, że siły ścinające oraz lokalne warunki hydrodynamiczne istotnie modulują przebieg agregacji, prowadząc do równoczesnego powstawania kilku typów struktur wtórnych. Wskazuje to, że agregacja w przepływie nie przebiega w sposób jednorodny; przeciwnie - ma bardziej złożony charakter i obejmuje szereg równoległych procesów, odmiennych od tych zachodzących podczas inkubacji z wytrząsaniem.

W przypadku nanospektroskopii IR (nanoIR) liczba możliwych punktów pomiarowych była ograniczona warunkami technicznymi. Struktury HCC tworzone w pH 4 miały niewielkie wymiary, co utrudniało znalezienie stabilnych miejsc, w których sygnał IR był wystarczająco intensywny, a kontakt termiczny między dźwignią AFM a próbką pozostawał stabilny. Z tego powodu pomiary wykonano w dwóch lokalizacjach w obrębie tego samego agregatu, które spełniały kryteria jakości sygnału i umożliwiały wiarygodną dekonwolucję pasma amidowego I.



Rysunek 101. Obraz nanoIR próbki HCC po 8 godzinach inkubacji w mikroprzepływie (pH 4) (górną). Zaznaczony obszar wskazuje miejsce pomiaru widma nanoIR przedstawionego w dolnej części. Widmo nanoIR oraz dekonwolucja pasma amidowego I (1720–1580 cm^{-1}) dla tej samej próbki (dół). Linia czarna - widmo eksperymentalne, linia pomarańczowa - dopasowanie modelu, linie przerywane - komponenty Gaussa.



Rysunek 102. Obraz nanoIR próbki HCC po 8 godzinach inkubacji w mikroprzepływie (pH 4) (górną). Zaznaczony obszar wskazuje miejsce pomiaru widma nanoIR przedstawionego w dolnej części. Widmo nanoIR oraz dekonwolucja pasma amidowego I (1720–1580 cm^{-1}) dla tej samej próbki (dół). Linia czarna - widmo eksperymentalne, linia pomarańczowa - dopasowanie modelu, linie przerywane - komponenty Gaussa.

Zastosowano model dekonwolucji oparty na dopasowaniu wieloskładnikowych funkcji Gaussa, który dobrze odwzorowuje przebieg pasma amidowego I. Dla wszystkich widm (zarówno ATR-FTIR, jak i nanoIR) uzyskano wysokie wartości współczynnika determinacji $R^2 = 0.989\text{--}0.9995$ oraz niskie błędy RMSE (<0.03 dla znormalizowanej intensywności). Analiza reszt dopasowania nie wykazała systematycznych odchyleń - różnice pomiędzy widmem doświadczalnym a modelem oscylują wokół zera i nie przekraczają kilku procent sygnału. Dopasowanie jest stabilne, a uzyskane udziały struktur drugorzędowych można uznać za wiarygodne. Wartości te zestawiono w tabeli 10, która porządkuje udziały poszczególnych struktur (β -arkusz, β -zakręt, α -helisa, struktury nieuporządkowane) dla próbek inkubowanych z wytrząsaniem oraz w warunkach przepływu. Warto podkreślić, że ATR-FTIR rejestruje uśrednione widmo całej próbki, natomiast nanoIR dostarcza informacji lokalnych i analizuje pojedyncze agregaty, co naturalnie prowadzi do różnic pomiędzy wynikami uzyskiwanymi tymi dwiema technikami.

Tabela 10. Udział procentowy struktur drugorzędowych białka HCC po 6 dniach inkubacji w pH 4 (ATR-FTIR oraz nanoIR) oraz po 8 godzinach inkubacji w warunkach mikroprzepływu (nanoIR). Zestawiono zawartość β -arkuszy (regularnych i zagregowanych), β -zakrętów, α -helisy oraz struktur nieuporządkowanych dla różnych lokalizacji pomiaru.

Próbka	β arkusz [%]	β arkusz (zagregowany) [%]	β razem [%]	α helisa [%]	struktury nieuporządkowane [%]	β zakręt [%]
HCC inkubacja 6 dni (ATR)	43,5	1,0	44,5	25,9	28,8	0,8
HCC inkubacja 6 dni (pomiar 1, nanoIR)	42,9	3,3	46,2	3,5	15,2	35,1
HCC inkubacja 6 dni (pomiar 2, nanoIR)	41,5	2,7	44,2	3,5	11,4	40,9
HCC przepływ 8h (pomiar 1, nanoIR)	11,0	4,2	15,2	39,7	21,1	24,0
HCC przepływ 8h (pomiar 2, nanoIR)	28,9	23,6	52,5	9,3	6,8	31,4

Zestawienie wyników nanoIR z pomiarami dichroizmu kołowego jednoznacznie pokazuje, że obie techniki opisują ten sam kierunek zmian struktury drugorzędowej białka, choć każda rejestruje je na innym poziomie szczegółowości. CD odzwierciedla zmianę konformacji w skali całej próbki i wykazuje globalny spadek udziału struktur helikalnych przy równoczesnym narastaniu komponentów β . NanoIR natomiast ujawnia, że proces ten nie przebiega jednorodnie - w obrębie jednej próbki obecne są rejony silnie wzbogacone w struktury β , jak i obszary bardziej helikalne lub nieuporządkowane. Ta lokalna heterogeniczność nie jest widoczna w CD ze względu na objętościowy charakter tej techniki, ale jest w pełni zgodna z kierunkiem zmian wskazywanym przez analizę

CDSSTR. Zestawienie wyników nanoIR z widmami dichroizmu kołowego oraz danymi literaturowymi dodatkowo potwierdza charakter zmian zachodzących w strukturze HCC. W pracy Gospodarczyka i Kozak [204] widma CD dla A β ₁₋₄₂ wykazywały stopniowe pogłębianie minimum przy ok. 215 nm wraz z czasem inkubacji, co jednoznacznie interpretowano jako wzrost udziału struktur β -arkuszowych i formowanie fibrylarnej organizacji.

Podsumowując, równoległa analiza nanoIR i dichroizmu kołowego wskazuje, że mikroprzepływ prowadzi do wieloetapowej reorganizacji struktury drugorzędowej HCC w kierunku form o podwyższonym udziale struktur β -arkuszowych, przy czym proces ten charakteryzuje się wyraźną heterogenicznością lokalną. Widma CD odzwierciedlają globalny wzrost komponentu β w skali całej próbki, natomiast nanoIR ujawnia, że agregaty powstające w przepływie nie tworzą jednorodnej populacji, lecz zbiór domen różniących się stopniem uporządkowania. Zestawienie wyników obu metod pozwala zatem uchwycić zarówno ogólny kierunek zmian konformacyjnych, jak i ich przestrzenną złożoność - co stanowi kluczowy element dla pełnego zrozumienia mechanizmu agregacji HCC w warunkach mikroprzepływu.

Podobną skalę heterogeniczności strukturalnej odnotowano także w badaniach innych układów o tendencji do formowania włókien amyloidowych. Ruggeri i współpracownicy, analizując agregację domeny Josephin techniką nanoIR, wykazali, że początkowe etapy tworzenia agregatów obejmują kilka równoległe istniejących populacji - od cząstek zachowujących strukturę przypominającą stan natywny, przez formy częściowo misfoldowane, aż po dojrzałe włókna [257]. Towarzyszą im znaczące różnice w składzie struktury wtórnej i w sygnaturze widmowej pasma amidowego I, co autorzy interpretowali jako wynik etapowego dojrzewania agregatów. Ten obraz jest zgodny z obserwacjami dla HCC w warunkach mikroprzepływu: również tutaj nanoIR ujawnia współistnienie regionów o dominujących strukturach β obok obszarów bardziej helikalnych lub słabo uporządkowanych. Takie zróżnicowanie lokalne wskazuje, że proces nie przebiega w sposób jednolity, lecz obejmuje równoległe ścieżki strukturalne. Banerjee i współpracownicy zastosowali AFM-IR do monitorowania przemian konformacyjnych podczas agregacji peptydu A β ₁₋₄₂ i wykazali, że już na poziomie najmniejszych oligomerów pojawiają się wyraźnie różniące się strukturalnie populacje [258]. Autorzy podkreślają, że heterogeniczność obecna w oligomerach nie zanika w późniejszych etapach - przeciwnie, zostaje „utrwalona” podczas tworzenia protofibryli i dojrzałych włókien, które często zawierają segmenty pozbawione typowego uporządkowania β -arkuszowego. Wyniki te są szczególnie istotne w kontekście obserwacji dla HCC, ponieważ wskazują, że współistnienie regionów silnie β -strukturalnych z obszarami bardziej helikalnymi lub nieuporządkowanymi jest typową cechą systemów agregujących, a nie odstępstwem od klasycznego modelu amyloidogenezy.

Heterogeniczność strukturalna amyloidów została potwierdzona również technikami niezwiązanymi bezpośrednio z spektroskopią IR, np. metodami nanofluidycznymi. Sasanian i współpracownicy analizowali właściwości pojedynczych włókien A β ₁₋₄₂ i α -synukleiny w nanokanałach, wykazując, że poszczególne fibryle różnią się znacząco sztywnością i elastycznością, mimo że powstawały w identycznych warunkach [259].

Autorzy interpretowali te różnice jako przejaw polimorfizmu strukturalnego włókien i wskazywali, że heterogeniczne domeny w obrębie pojedynczego włókna mogą być bezpośrednim odzwierciedleniem zróżnicowanego składu struktur wtórnych na poziomie molekularnym. Wnioski te są spójne z wynikami uzyskanymi metodą nanoIR dla HCC, gdzie w obrębie jednego agregatu obserwuje się współistnienie segmentów bogatych w struktury β z obszarami dominacji konformacji helikalnych lub nieuporządkowanych. Zarówno prace Banerjee i wsp., Ruggeri i wsp., jak i Sasanian i wsp. potwierdzają, że heterogeniczność strukturalna jest zjawiskiem powszechnym dla układów amyloidowych - niezależnie od ich składu białkowego, metody obrazowania czy środowiska formowania, co dodatkowo wzmacnia interpretację wyników uzyskanych dla HCC w warunkach mikroprzepływu.

7 Dyskusja wyników

Celem przeprowadzonych badań było zrozumienie, w jaki sposób wyselekcjonowane jako modelowe nanocząstki tlenku miedzi (CuO) wpływają na strukturę ludzkiej cystatyny C (HCC), jej zdolność do agregacji oraz jak obecność tych agregatów oddziałuje na komórki neuronalne SH-SY5Y. Analiza objęła zarówno stabilność formy natywnej białka, jak i późniejsze etapy jego przemian - od pierwszych zaburzeń struktury, poprzez tworzenie włókien amyloidowych, aż do powstawania zaawansowanych agregatów obserwowanych podczas inkubacji z wytrząsaniem oraz pod wpływem przepływu w układzie mikrofluidycznym. Aby scharakteryzować oczekiwane zmiany w pracy zastosowano szereg technik spektroskopowych i strukturalnych, w tym spektrofotometrię UV-Vis, spektroskopię w podczerwieni FTIR, nanospektroskopia AFM-IR, dichroizm kołowy CD, małokątowe rozpraszanie rentgenowskie SAXS, mikroskopię sił atomowych AFM, testy amyloidogenezy z użyciem fluorescencji tioflawiny T, analizy termiczne oraz testy komórkowe. Zestawienie tych wyników umożliwiło zaproponowanie spójnego modelu oddziaływań CuO-HCC oraz ich skutków biologicznych.

Na początku badań jednoznacznie potwierdzono, że syntezowane nanocząstki CuO charakteryzują się wysoką czystością chemiczną i strukturalną. Spektroskopia UV-Vis wykazała charakterystyczne pasmo absorpcji dla CuO, brak sygnałów dla formy metalicznej Cu⁰ lub Cu₂O. Dyfrakcja rentgenowska potwierdziła oczekiwaną jednoskośną strukturę krystaliczną (C2/c), a analiza Rietvelda wskazała na dobre dopasowanie modelu strukturalnego do danych eksperymentalnych. Zdjęcia TEM pokazały cząstki CuO o rozmiarze ok. 5–6 nm, miejscami tworzące aglomeraty, jednak o przewidywalnym kształcie i niewielkiej polidispersyjności. Tak przygotowany materiał był stabilny w roztworach wodnych i buforowych, co umożliwiło jego użycie w dalszych eksperymentach.

Na tym etapie ważne było również zweryfikowanie przydatności alternatywnych materiałów do badań - nanocząstek Cu₂O, Cu czy komercyjnych nanomateriałów o dużej agregacji. Jednak tylko własnoręcznie zsyntetyzowane nanocząstki CuO dawały powtarzalne wyniki i pozwalały na kontrolę stężenia, dyspersji i składu chemicznego. Dzięki temu kolejne etapy badań nie były obciążone niepewnością co do charakterystyki używanego nanomateriału.

Pierwszym etapem badań z udziałem ludzkiej cystatyny C było sprawdzenie, czy nanocząstki CuO wpływają na stabilność struktury natywnej HCC. Pomiar termicznej stabilności wykazały, że zarówno CuO, jak i jony Cu²⁺ obniżają temperaturę topnienia (T_m) białka. Efekt ten był widoczny zarówno dla monomeru, jak i dimeru HCC, co wskazuje, że zakłóceniu ulegają zarówno oddziaływania wewnątrzcząsteczkowe, jak i międzycząsteczkowe.

W przypadku monomeru T_m obniżało się o kilka stopni po dodaniu CuO, a jeszcze bardziej w obecności jonów Cu²⁺, co sugeruje, że jony miedzi oddziałują bezpośrednio z białkiem i destabilizują jego strukturę. W przypadku dimeru HCC obserwowano dwa

etapy topnienia – odpowiadające rozpadowi dimeru i denaturacji monomeru - a oba były przesunięte w kierunku niższych temperatur w obecności CuO i Cu²⁺. Taka zmiana profilu wskazuje, że interakcje z miedzią zaburzają naturalną stabilność układu HCC już na wczesnym etapie, jeszcze przed rozpoczęciem widocznej agregacji.

Te wyniki można interpretować jako pierwszy krok procesu, w którym CuO lub miedź w formie jonowej obniża barierę energetyczną przejścia do stanu częściowo rozwiniętego. Stan taki jest bardziej podatny na oddziaływania międzycząsteczkowe, co sprzyja dalszej agregacji.

Przy pH 6, zbliżonym do warunków fizjologicznych, samo białko HCC nie wykazywało tendencji do tworzenia struktur amyloidowych - obserwowano brak znaczących zmian fluorescencji tioflawiny T. Jednak już po dodaniu nanocząstek CuO widać było wyraźny wzrost intensywności fluorescencji ThT, co oznacza, że CuO inicjuje lub przyspiesza tworzenie struktur bogatych w motywy β .

AFM potwierdziło obecność włókien w pobliżu cząstek CuO. W wielu przypadkach nanocząstki były pokryte cienką warstwą białka, a od tych kompleksów wyrastały dobrze wykształcone włókniste struktury. Można to interpretować jako powstawanie tzw. „korony białkowej”, gdzie białko adsorbuje się na powierzchni nanocząstki, stabilizuje się w zmienionej konformacji i staje się punktem nukleacji dla dalszego wzrostu agregatu [260].

Wyznaczone w badaniach AFM profile wysokościowe pozwolił rozróżnić pojedyncze nanocząstki (~5 nm), cienkie fibryle białkowe (~1–2 nm) oraz większe struktury złożone z nanocząstki CuO i otaczającego białka (~6–7 nm). Potwierdza to, że CuO nie jest biernym dodatkiem, ale aktywnie uczestniczy w inicjacji agregacji – tworząc miejsca sprzyjające przejściu białka do formy fibrylarnej.

Ludzka cystatyna C posiada potencjalne miejsca koordynacji jonów miedzi zlokalizowane w pobliżu reszt histydynowych (His86 i His90), co sugerują wcześniejsze analizy strukturalne [197,261]. Wiązanie Cu²⁺, nawet jeśli jest słabe, może sprzyjać powstawaniu dimerów lub niewielkich oligomerów HCC oraz wpływać na równowagę między formą natywną a częściowo rozwiniętą.

Drugim istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg agregacji jest oddziaływanie cystatyny C z powierzchnią nanocząstek CuO. Można przyjąć, że jony Cu²⁺ i powierzchnia nanocząstki działają synergistycznie - jony modulują strukturę białka, natomiast CuO stanowi fizyczne podłoże sprzyjające adsorpcji, lokalnym zmianom konformacyjnym i inicjacji struktur β .

Podobne zjawiska obserwowano dla innych białek – m.in. albuminy surowicy bydlęcej (BSA) [261] oraz β -galaktozydazy [262], gdzie kontakt z nanocząstkami miedzi prowadził do zmian w strukturze drugorzędowej. W przypadku BSA wykazano, że Cu NPs wiążą się spontanicznie, poprzez głównie oddziaływania hydrofobowe, prowadząc do spadku zawartości α helisy. W przypadku β -galaktozydazy nanocząstki CuO powodowały częściowe rozwinięcie struktury białka oraz spadek aktywności

enzymatycznej. W obu przypadkach nanocząstki zaburzały konformację natywną białek, co bezpośrednio wpływało na ich funkcję.

W środowisku o pH 4, które sprzyja destabilizacji cystatyny C, białko samoistnie tworzy agregaty. Zgodnie z pomiarami fluorescencji ThT, w próbce kontrolnej HCC obserwuje się wyraźny wzrost sygnału, wskazujący na formowanie struktur o charakterze amyloidowym. Dodatek nanocząstek CuO modyfikuje ten proces w sposób zależny od stężenia. Najniższe stężenie nanocząstek (22,5 $\mu\text{g/ml}$) prowadzi do obniżenia sygnału ThT względem kontroli, co sugeruje powstawanie struktur o odmiennej organizacji niż klasyczne fibryle. Natomiast wyższe stężenia CuO (90 i 225 $\mu\text{g/ml}$) powodują ponowny wzrost intensywności fluorescencji, choć nadal nie osiąga on wartości obserwowanych dla samego HCC.

Obrazy AFM potwierdzają te obserwacje i ujawniają wyraźne różnice morfologiczne pomiędzy warunkami. Dla stężenia 22,5 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek CuO dominują struktury pierścieniowe, charakteryzujące się wyraźnie podwyższoną strefą brzegową (ok. 14–22 nm, mediana \sim 15–16 nm) oraz znacznie niższą częścią centralną (2–5 nm). Przy 90 $\mu\text{g/ml}$ CuO NPs obserwuje się pojedyncze włókienkowate struktury o wysokości około 2–3 nm. Najwyższe stężenie, 225 $\mu\text{g/ml}$ nanocząstek CuO, prowadzi do powstawania grubszych włókien (wysokość 4–10 nm), które lokalnie łączą się w uporządkowane wiązki.

Spektroskopia ATR-FTIR pozwoliła określić skład struktury drugorzędowej HCC po 6 dniach inkubacji w pH 4. Dekonwolucja pasma amidowego I wykazała, że dominującym elementem struktury są motywy β -a ich łączny udział wynosi ok. 44–46%. Udział α -helisy jest niewielki (ok. 26%), natomiast pozostałą część struktury stanowią segmenty nieuporządkowane i β -zakręty.

Analiza lokalna metodą nanoIR potwierdziła obecność struktury z przewagą elementów β , ale jednocześnie ujawniła, że próbka nie jest jednorodna. W różnych punktach mierzonych na powierzchni agregatów udział β -arkusza mieścił się w zakresie 41–43%, β -zakrętów w zakresie 35–41%, a ilość α -helisy była bardzo niska (3–4%). Różnice pomiędzy poszczególnymi regionami wskazują, że agregaty nie dojrzewają równomiernie i poszczególne obszary mogą reprezentować różne stadia organizacji drugorzędowej.

Wyniki uzyskane metodami ATR-FTIR oraz nanoIR wskazują jednoznacznie, że agregaty HCC tworzące się w pH 4 charakteryzują się dominacją struktur β (ok. 41–46%) przy bardzo niskim udziale elementów helikalnych. Taki kierunek reorganizacji drugorzędowej jest zgodny z danymi literaturowymi dotyczącymi ludzkiej cystatyny C. W badaniach Grubba i wsp. [170] wykazano, że podczas przejścia od monomeru do oligomerów i dalej do włókien amyloidowych widmo CD ulega przesunięciu minimum eliptyczności w stronę \sim 220 nm, co odpowiada narastającemu udziałowi struktur β . Choć metody różnią się zakresem informacji, zarówno wyniki uzyskane w niniejszej pracy, jak i widma CD opisywane przez Grubba wskazują na tę samą tendencję - uporządkowanie struktury wtórnej cystatyny C w kierunku form bogatych w motywy β . Porównanie morfologii również ujawnia istotne podobieństwa. W pracy Grubba i wsp. na podstawie

zdjęć TEM opisano obecność pierścieniowych oligomerów o średnicy zewnętrznej ~13–14 nm, średnicy wewnętrznej ~2–3 nm oraz szerokości pierścienia ~5–6 nm. Struktury obserwowane w niniejszej pracy metodą AFM w układzie HCC + CuO (22,5 µg/ml) wykazują analogiczną morfologię - podwyższoną, pierścieniową krawędź o średnicy 14–22 nm oraz obniżony środek o wysokości 2–5 nm. Mimo że AFM mierzy wysokość, a TEM - wymiary w płaszczyźnie XY, ogólny kształt oligomerów pozostaje porównywalny.

Badania w systemie mikroprzepływowym miały na celu sprawdzenie czy przepływ może modyfikować przebieg agregacji HCC. Już po 8 godzinach inkubacji w chipie mikrofluidycznym widoczne były struktury włókniste zarówno przy pH 6, jak i przy pH 4. Oznacza to, że przepływ znacząco przyspiesza proces agregacji - w warunkach wytrząsania podobny stopień uporządkowania obserwowano dopiero po kilkunastu godzinach.

Zbliżony efekt opisano wcześniej dla peptydu A β ₁₋₄₂ którego agregacja w mikrochipie przepływowym zachodziła wielokrotnie szybciej niż podczas klasycznej inkubacji - poziom włókien obserwowany po 4 godzinach przepływu nie pojawiał się nawet po 12–96 godzinach w warunkach inkubacji z wytrząsaniem [204]. Za główny czynnik przyspieszający uznano działanie sił ścinających, które ułatwiają inicjację agregacji oraz wpływają na dalszy wzrost i morfologię włókien. Wnioski te są spójne z obserwacjami dla HCC, gdzie przepływ nie tylko przyspiesza proces agregacji, lecz także prowadzi do powstawania większej liczby włóknistych struktur w porównaniu z warunkami inkubacji z wytrząsaniem.

Proces agregacji białka monitorowano za pomocą techniki SAXS. Analiza danych wykazała, że wraz z czasem inkubacji w układzie mikroprzepływowym rośnie intensywność rozpraszania przy małych kątach, co przekłada się na stopniowe zwiększanie promienia żyracji R_g oraz intensywności $I(0)$. Tendencja ta wskazuje na systematyczne powiększanie się dominujących agregatów białkowych [263]. W próbkach zawierających jedynie nanocząstki CuO, jak również w układach HCC + CuO analizowanych po krótkim czasie przepływu (5–6 godzin), nie było możliwe wiarygodne wyznaczenie R_g metodą Guiniera ani rekonstrukcja funkcji $p(r)$ w programie GNOM. Krzywe SAXS w tych warunkach nie spełniały kryteriów liniowości w zakresie Guiniera, co jest charakterystyczne dla układów o silnej polidispersji, zawierających populacje cząstek o nieregularnym kształcie [263,264]. Szczególnie wyraźne zmiany zaobserwowano w próbkach zawierających CuO NPs. Obecność nanocząstek prowadziła do szybszego wzrostu intensywności w niskich q oraz wyższych wartości R_g niż w próbkach z samym HCC poddanych przepływowi. Wskazuje to, że CuO NPs dodatkowo modulują przebieg agregacji - mogą pełnić funkcję lokalnych centrów adsorpcji i reorganizacji białka, sprzyjając powstawaniu większych agregatów o bardziej złożonej morfologii. Tendencję tę potwierdzają także zwiększone wartości D_{max} i objętości Poroda, świadczące o narastającej rozbudowie przestrzennej struktur białkowych w obecności CuO.

Pogłębienie analizy metodą nanoIR próbek inkubowanych w warunkach przepływu (pH 4, 8 h) ujawniło bardzo szeroki zakres wartości udziału struktur drugorzędowych. Udział struktur β w analizowanych punktach wynosił od ok. 11% do ponad 52%, natomiast ilość struktur α -helikalnych mieściła się w przedziale 4–24%. Tak duże rozproszenie wartości wskazuje, że w warunkach mikroprzepływu powstają agregaty o bardzo zróżnicowanym stopniu uporządkowania - od regionów słabo zorganizowanych po obszary wyraźnie bogate w motywy β . Wysoka heterogeniczność sugeruje, że siły ścinające działające w kanale mogą prowadzić do lokalnej destabilizacji włókien, ich fragmentacji, a następnie ponownej nukleacji w innych miejscach układu. W efekcie struktury rozwijają się niesynchronicznie, co odróżnia próbki przepływowe od bardziej jednorodnych agregatów powstających w warunkach wytrząsania.

Wartości naprężeń ścinających uzyskane w zastosowanym układzie mikroprzepływowym (ok. 1–1,5 Pa) mieszczą się w zakresie uznawanym za fizjologiczny. W literaturze [265] podaje się, że naprężenia ścinające w naczyniach mikrokrażenia wynoszą zwykle 0,5–2 Pa, natomiast w naczyniach włosowatych mózgu mieszczą się w przedziale 0,3–2 Pa. Szerzej, dla tkanek biologicznych wartości fizjologiczne mieszczą się w zakresie 0,1–6 Pa, w zależności od typu naczynia i lokalnych warunków hemodynamicznych [265]. Wartości w przeprowadzonym eksperymencie mikroprzepływowym odpowiadają również rzeczywistym prędkościom przepływu obserwowanym w układzie krążenia. W naczyniach włosowatych i tętniczkach mózgowych przepływ krwi wynosi zazwyczaj od kilku milimetrów do kilkudziesięciu centymetrów na sekundę, a w niektórych tętnicach mózgu może osiągać nawet ok. 50 cm/s [266]. W modelach mikroprzepływowych stosowanych do odwzorowania warunków *in vivo* wykorzystuje się przepływy w zakresie 0,1 μ l/min – 3 ml/min oraz prędkości od 0,1 mm/s do 100 mm/s, co odzwierciedla fizjologiczne zróżnicowanie sieci naczyniowej [203,204].

Zastosowany układ mikroprzepływowo umożliwia odwzorowanie warunków mechanicznych, które w środowisku *in vivo* oddziałują na białka i komórki. Mikroprzepływowe systemy są szeroko stosowane do modelowania hemodynamicznego środowiska naczyń, ponieważ pozwalają precyzyjnie kontrolować siłę ścinającą, ciśnienie i geometrię kanału [267]. W literaturze podkreśla się, że tego typu układy wiernie odtwarzają warunki mikrokrażenia, gdzie przepływ jest laminarny, a kluczowym czynnikiem oddziałującym na białka jest naprężenie ścinające. Udowodniono także, że w takich warunkach przepływ może przyspieszać amyloidogenezę, co wcześniej wykazano m.in. dla peptydu $A\beta_{1-42}$ i insuliny [268].

Podobny efekt zaobserwowano w niniejszej pracy, gdzie przepływ znacząco przyspieszał formowanie agregatów HCC oraz prowadził do struktur bardziej wydłużonych i heterogenicznych niż w warunkach inkubacji z wytrząsaniem. Zjawiska te, szybsza agregacja, zmiana morfologii włókien i większa strukturalna niejednorodność, można uznać za potencjalnie istotne dla zrozumienia amyloidogenezy *in vivo*, w tym odkładania amyloidów w ścianach naczyń mózgowych oraz możliwej roli sił ścinających w dojrzewaniu agregatów.

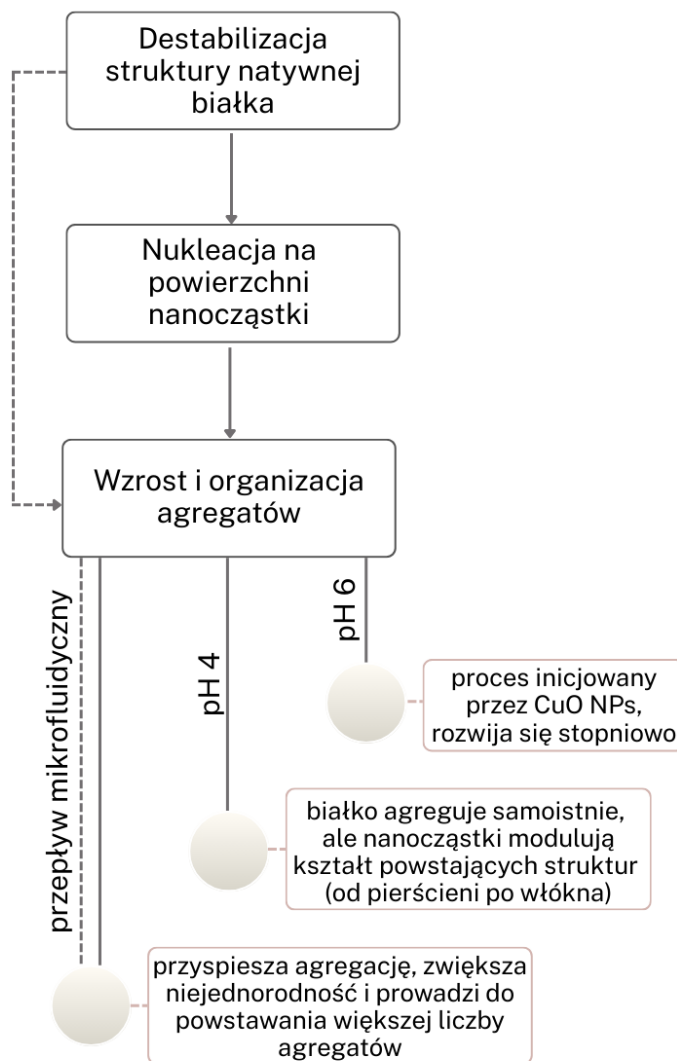
Testy cytotoxyczności przeprowadzone na modelowej linii komórkowej neuroblastomy SH-SY5Y wykazały, że ani kontrolna próbka zawierająca tylko białko HCC, ani roztwór referencyjny nanocząstek CuO w badanych stężeniach nie obniżyły istotnie przeżywalności komórek SH-SY5Y. Wyraźny spadek żywotności obserwowano dopiero po ich jednoczesnym zastosowaniu, co sugeruje, że to forma agregującego białka w obecności CuO, a nie pojedyncze komponenty, stanowi biologicznie aktywną i potencjalnie toksyczną postać. W tych samych próbkach zaobserwowano także istotny wzrost poziomu reaktywnych form tlenu (ROS), szczególnie w obecności włóknistych agregatów HCC związanych z CuO, co wskazuje na indukcję stresu oksydacyjnego. Warto jednak podkreślić, że choć zarówno HCC, jak i CuO NPs wykazują jedynie ograniczoną aktywność biologiczną stosowane osobno, to ich jednoczesne zastosowanie prowadzi do wyraźnie nasilonej generacji ROS. Zarówno analiza ANOVA dla CuO NPs, jak i testy porównawcze dla mieszanin HCC + CuO wskazują, że dopiero współwystępowanie obu komponentów powoduje istotny, narastający w czasie wzrost sygnału DCF. Wyniki te sugerują, że kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za obserwowany efekt jest forma agregującego białka powstająca w obecności CuO, a nie każdy z elementów stosowany osobno.

Do oceny żywotności zastosowano test WST-1. W przeciwieństwie do klasycznej metody MTT, barwnik WST-1 jest redukowany pozakomórkowo, a powstający barwny formazan pozostaje w roztworze. Dzięki temu metoda ta jest mniej podatna na interferencje z nanocząstkami, które mogą adsorbować lub redukować MTT niezależnie od metabolizmu komórkowego, prowadząc do wyników fałszywie dodatnich. Test za pomocą WST-1 zapewnia większą wiarygodność w badaniach obejmujących nanomateriały lub związki o aktywności redoks [269,270]. Uzyskane w ramach testów komórkowych wyniki wskazują więc, że to agregaty HCC powstające w obecności CuO NPs, a nie same nanocząstki, są głównym źródłem stresu oksydacyjnego i cytotoxyczności.

Przeprowadzone badania pokazują, że przebieg agregacji HCC zależy zarówno od pH, jak i obecności nanocząstek oraz warunków fizycznych środowiska. Nanocząstki CuO destabilizują strukturę natywną białka, inicjują proces agregacji i wpływają na morfologię powstających struktur. Z kolei przepływ przyspiesza ten proces oraz zwiększa jego heterogeniczność, prowadząc do powstawania struktur bardziej wydłużonych i zróżnicowanych. Agregaty HCC formowane w obecności CuO wykazują aktywność biologiczną, generują stres oksydacyjny i obniżają przeżywalność komórek, co sugeruje, że mogą stanowić potencjalnie toksyczną formę także w warunkach *in vivo*.

Biorąc pod uwagę, że nanocząstki tlenków metali są obecne w zanieczyszczonym powietrzu i mogą potencjalnie akumulować się w tkankach, wyniki te wskazują, że czynniki środowiskowe mogą realnie modulować procesy amyloidogenezy. W takich warunkach nanocząstki mogą nie tylko inicjować agregację cystatyny C, ale także zwiększać jej toksyczność, potencjalnie wpływając na rozwój chorób neurodegeneracyjnych i naczyniowych.

Na podstawie uzyskanych wyników eksperymentalnych można zaproponować spójny mechanizm agregacji HCC w obecności nanocząstek CuO. Na Rysunku 103 przedstawiono uproszczony schemat ilustrujący przebieg kolejnych etapów tego procesu, natomiast poniżej szczegółowo omówiono ich znaczenie oraz zależności wynikające z warunków środowiskowych.



Rysunek 103. Schemat proponowanego mechanizmu agregacji HCC modulowanej przez nanocząstki CuO i przepływ mikrofluidyczny. Proces obejmuje destabilizację struktury natywnej białka, nukleację heterogeniczną na powierzchni nanocząstek CuO oraz wzrost i organizację agregatów. Dolna część schematu przedstawia wpływ pH i warunków przepływu na morfologię i dynamikę agregacji.

1. Destabilizacja struktury natywnej białka

Pierwszym etapem proponowanego mechanizmu jest obniżenie stabilności cystatyny C w obecności nanocząstek CuO. Wykazany w badaniach spadek temperatury topnienia monomeru i dimeru HCC wskazuje, że kontakt z CuO NPs sprzyja przechodzeniu białka do form częściowo rozfałdowanych. Tego typu struktury są bardziej podatne na oddziaływania międzycząsteczkowe oraz reorganizacje drugorzędowe, co tworzy warunki sprzyjające inicjacji agregacji. Oznacza to, że nanocząstki działają jak czynnik przygotowujący białko do dalszych etapów samoorganizacji.

2. Nukleacja na powierzchni nanocząstki (korona białkowa)

Po przejściu w stan o obniżonej stabilności HCC adsorbuje się na powierzchni CuO NPs, tworząc tzw. koronę białkową. Adsorpcja ta może stabilizować określone konformacje białka, a jednocześnie lokalnie zwiększać jego stężenie, co sprzyja nukleacji heterogenicznej. W efekcie nanocząstki pełnią rolę „szablonu”, na którym formują się pierwsze stabilne agregaty, często bogate w elementy β -arkusza.

3. Wzrost i organizacja agregatów

Po etapie nukleacji następuje dalszy wzrost agregatów, którego przebieg zależy od pH oraz dynamiki układu. Analizy SAXS, AFM i nanoIR potwierdzają, że agregaty nie powstają jako jednorodne formy, lecz przechodzą reorganizację przestrzenną i strukturalną. Wzrost może prowadzić do form pierścieniowych, oligomerycznych lub włóknistych, a CuO modyfikuje ten proces, działając jako centrum organizacji lokalnej i wpływając na dynamikę oraz morfologię tworzących się struktur.

3.1. pH 6 - proces inicjowany przez nanocząstki CuO

Przy pH 6 samo białko nie wykazuje tendencji do agregacji. Dopiero obecność CuO NPs inicjuje powstawanie pierwszych struktur, które następnie rozwijają się stopniowo. Formy włókniste są nieliczne i stosunkowo krótkie, co wskazuje, że w warunkach bliskich fizjologicznym nanocząstki pełnią głównie rolę inicjatora procesu.

3.2. pH 4 - modulacja kształtu przez nanocząstki CuO

W środowisku kwaśnym HCC agreguje spontanicznie, jednak obecność nanocząstek silnie wpływa na morfologię powstających struktur:

- niskie stężenie nanocząstek CuO (22,5 $\mu\text{g/ml}$) \rightarrow dominują pierścieniowe oligomery (wysokie krawędzie 14–22 nm, centralna część 2–5 nm),

- średnie stężenie nanocząstek CuO (90 $\mu\text{g/ml}$) \rightarrow cienkie, pojedyncze włókna (2–3 nm),
- wysokie stężenie nanocząstek CuO (225 $\mu\text{g/ml}$) \rightarrow grube, lokalnie uporządkowane wiązki włókien (4–10 nm).

Oznacza to, że CuO nie tylko przyspiesza proces, ale również kierkuje morfologię powstających agregatów.

3.3. Przepływ mikrofluidyczny – agregacja zachodzi szybciej, intensywniej, mniej jednorodnie

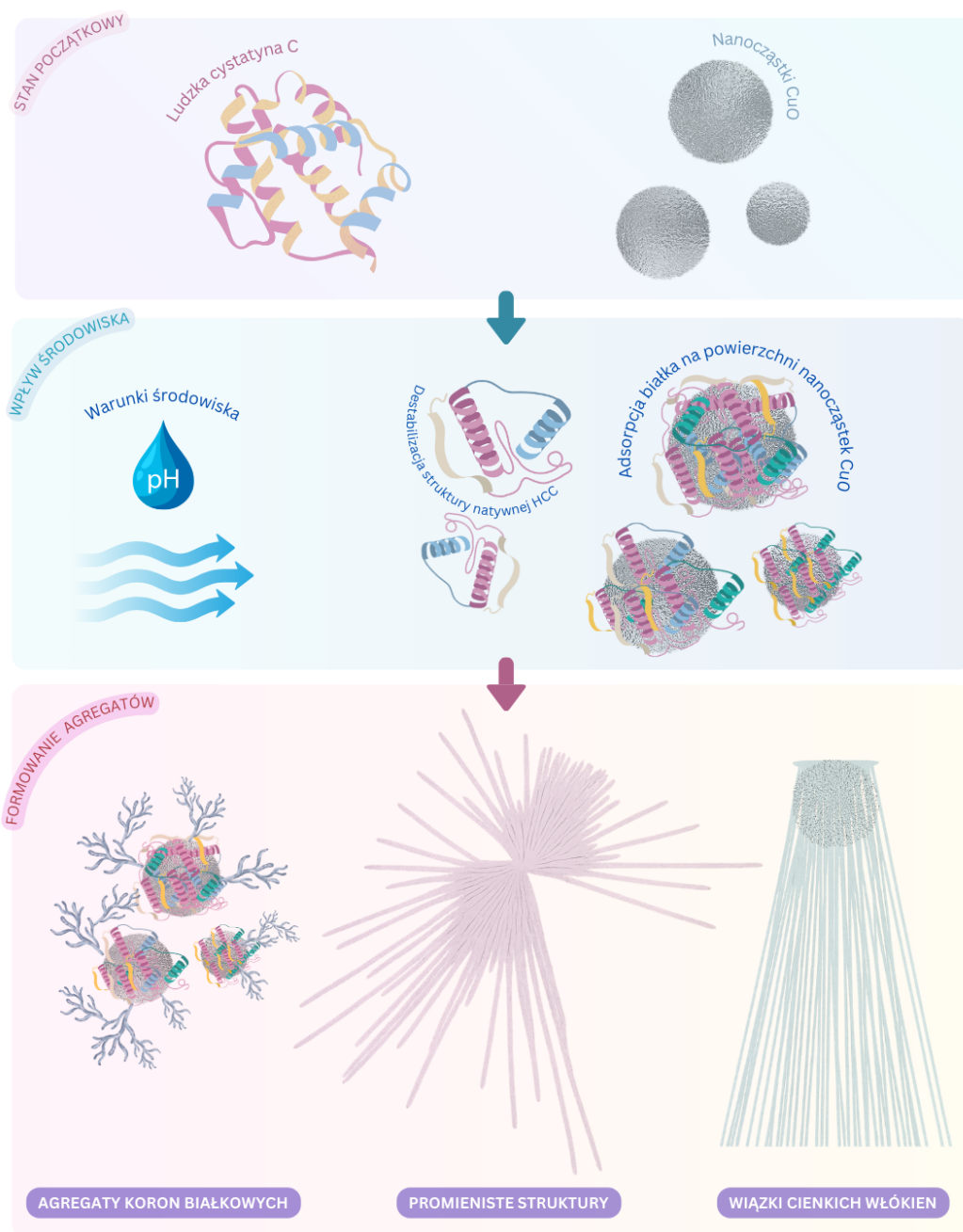
Warunki przepływu prowadzą do:

- przyspieszenia agregacji (wyższe $I(0)$ oraz większy R_g w badaniach SAXS),
- zwiększonej liczby formujących się agregatów,
- większej niejednorodności morfologicznej (brak liniowości zakresu Guiniera),
- wzrostu udziału struktur włóknistych.

Zjawisko to można interpretować jako efekt ciągłego odsłaniania świeżych powierzchni CuO oraz dynamicznego mieszania, co sprzyja tworzeniu wielu jąder nukleacji w krótkim czasie.

Łącznie przedstawione wyniki wskazują, że nanocząstki CuO pełnią wielowymiarową rolę w procesie agregacji cystatyny C - destabilizują białko, inicjują nukleację, a następnie kierkują morfologię powstających agregatów. Charakter tych zmian jest silnie zależny od pH środowiska oraz dynamiki układu, co pozwala lepiej zrozumieć warunki sprzyjające powstawaniu określonych form agregatów.

Aby uporządkować i syntetycznie przedstawić zależności między poszczególnymi etapami procesu, na Rysunku 104 zamieszczono schemat poglądowy mechanizmu formowania agregatów cystatyny C. Ilustracja obejmuje zarówno ścieżkę spontanicznej agregacji białka w warunkach kwaśnych, jak i procesy modyfikowane przez obecność CuO NPs. Schemat ma charakter koncepcyjny - uproszczono w nim proporcje i geometrię struktur, aby wyeksponować kluczowe etapy i wpływ czynników środowiskowych, a nie odwzorowywać dokładne parametry eksperymentalne.



Rysunek 104. Schemat proponowanego mechanizmu agregacji ludzkiej cystatyny C w obecności nanocząstek CuO. Etap I: stan początkowy białka i nanocząstek. Etap II: wpływ warunków środowiska (pH, przepływ) oraz oddziaływanie z nanocząstkami CuO, prowadzące do destabilizacji struktury natywnej HCC i adsorpcji białka na powierzchni nanocząstek. Etap III: powstawanie zróżnicowanych form agregatów - agregatów korony białkowej, promienistych struktur oraz wiązek cienkich włókien. Rysunek ma charakter schematyczny; proporcje, kształty struktur oraz geometria cząsteczki HCC nie odzwierciedlają dokładnych parametrów eksperymentalnych i zostały uproszczone w celu zachowania czytelności.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy warto również odnieść do obserwacji opisanych dla innych białek amyloidowych oraz dla cystatyny C badanej w alternatywnych warunkach środowiskowych. W wielu układach modelowych, obejmujących m.in. amyloid β [271–273], α -synukleinę [274,275], lizozym [203] czy insulinę [276,277], wykazano, że obecność obcych powierzchni, zmiana pH oraz warunki przepływu mogą znacząco modyfikować przebieg agregacji białek [278,279]. W badaniach nad oddziaływaniem białek z nanomateriałami wykazano, że nanocząstki mogą zarówno przyspieszać, jak i hamować tworzenie struktur amyloidowych, w zależności od typu oddziaływań na granicy faz [280]. Jednocześnie udowodniono, że adsorpcja białek na powierzchni nanocząstek prowadzi do formowania dynamicznej „korony białkowej”, której skład i stabilność zależą od właściwości materiału, a powstała korona może zmieniać konformacyjny krajobraz białek [281]. Ponadto pokazano, że wielkość oraz chemia powierzchni nanocząstek determinują sposób wiązania białek i mogą sprzyjać reorganizacji ich struktury, co wpływa na dalszy przebieg tworzenia oligomerów i fibryli [282].

Dopełnieniem tego kontekstu są prace Östner i wsp. [249] oraz Chrabąszczewskiej i wsp.[251] w których scharakteryzowano stabilizowane, jednorodnie oligomery cystatyny C. W obu badaniach uzyskano dobrze zdefiniowane struktury o ustalonej liczbie podjednostek i stałych wymiarach, możliwe do szczegółowej analizy metodami AFM, TEM i SAXS. W przeciwieństwie do tych stabilnych oligomerów, agregaty obserwowane w niniejszej pracy powstają w warunkach naturalnej, niekontrolowanej reorganizacji białka - pod wpływem zakwaszenia, obecności CuO NPs oraz mikroprzepływu. Prowadzi to do znacznie większej heterogeniczności form, obejmującej zarówno struktury oligomeryczne, jak i włókniste, oraz do intensywnego dojrzewania agregatów w czasie.

Tym samym zaprezentowane wyniki uzupełniają dotychczasową wiedzę na temat agregacji cystatyny C: badania stabilizowanych oligomerów dostarczają informacji o precyzyjnych, wyizolowanych stanach pośrednich, natomiast analiza przeprowadzona w niniejszej pracy pokazuje, jak białko zachowuje się w bardziej złożonych, dynamicznych warunkach środowiskowych. Połączenie tych dwóch perspektyw umożliwia pełniejszy opis etapów agregacji - od kontrolowanych, jednorodnych oligomerów po heterogeniczne, dynamiczne formy powstające w obecności nanomateriałów i w warunkach przepływu.

Mimo, że zastosowany model mikroprzepływowy, metody strukturalne i testy komórkowe pozwoliły szczegółowo zbadać mechanizmy agregacji HCC, należy uwzględnić pewne ograniczenia. Układ mikroprzepływowy nie odwzorowuje w pełni złożonej architektury tkanek - brakuje komórek śródbłonna, macierzy zewnątrzkomórkowej oraz elementów układu odpornościowego, które *in vivo* mogą modulować amyloidogenezę. Dodatkowo, testy cytotoxyczności przeprowadzono na jednej linii komórek nerwowych (SH-SY5Y), co ogranicza możliwość uogólnienia wyników na inne typy komórek neuronalnych lub naczyńniowych.

W przyszłości warto rozszerzyć badania o bardziej zaawansowane modele biologiczne, takie jak trójwymiarowe hodowle komórkowe, układy narząd-na-chipie (organ-on-chip)

lub mikroprzepływowe modele naczyń mózgowych (microvascular brain-on-chip). Takie systemy mogłyby wierniej odwzorować środowisko tkankowe, przepływ płynu mózgowo-rdzeniowego, barierę krew-mózg oraz interakcje pomiędzy agregatami białkowymi, komórkami i hemodynamiką. Cennym kierunkiem byłoby również zbadanie wpływu innych nanocząstek środowiskowych (np. Fe_2O_3 , ZnO , TiO_2) oraz sprawdzenie czy inhibitory agregacji (małe cząsteczki, peptydy, przeciwciała) mogą hamować powstawanie toksycznych form HCC w obecności CuO .

Przedstawione wyniki pokazują, że połączenie samodzielnie zsyntetyzowanych i dobrze scharakteryzowanych nanocząstek CuO oraz szerokiego zestawu technik badawczych pozwoliło kompleksowo przeanalizować zachowanie ludzkiej cystatyny C w warunkach istotnych zarówno biologicznie, jak i środowiskowo. Otrzymane dane wypełniają kilka ważnych luk badawczych: umożliwiają bezpośrednie porównanie przebiegu agregacji HCC w różnych warunkach fizykochemicznych, pokazują wpływ nanocząstek metali na reorganizację struktury białka oraz konsekwencje biologiczne potwierdzone testami komórkowymi. Zastosowanie układu mikroprzepływowego - samodzielnie złożonego i zoptymalizowanego - pozwoliło dodatkowo uchwycić dynamikę procesów agregacji w warunkach zbliżonych do fizjologicznych. Wszystkie te obserwacje razem tworzą spójny obraz, w którym zarówno właściwości nanocząstek, jak i warunki środowiska decydują o przebiegu samoorganizacji HCC. Stanowi to wartościowy punkt wyjścia do kolejnych badań, które pozwolą jeszcze dokładniej określić zależności pomiędzy warunkami środowiska, obecnością nanomateriałów a przebiegiem procesów agregacyjnych.

W oparciu o uzyskane i opracowane wyniki badań można wysunąć następujące wnioski:

- i. **Zsyntetyzowane nanocząstki CuO stanowiły stabilny i powtarzalny materiał do badań nad interakcją z ludzką cystatyną C.**

Nanocząstki charakteryzowały się oczekiwaną jednoskośną strukturą krystaliczną (C2/c), niewielkim rozmiarem (~5–6 nm), dobrą dyspersyjnością w roztworach wodnych i buforach oraz wysoką czystością chemiczną, co umożliwiło ich wiarygodne i kontrolowane zastosowanie eksperymentalne.

- ii. **Obecność nanocząstek CuO oraz jonów Cu²⁺ prowadziła do obniżenia stabilności struktury natywnej HCC jeszcze przed rozpoczęciem agregacji.**

Spadek temperatury topnienia monomeru i dimeru HCC, wykazany w badaniach termicznej stabilności białek, świadczy o ułatwieniu przejścia białka do stanu podatnego na oddziaływanie międzycząsteczkowe, co stanowi pierwszy etap procesu agregacji.

- iii. **Nanocząstki CuO inicjowały agregację HCC już w pH 6, czyli w warunkach, w których samo białko pozostaje w formie natywnej.**

W obecności CuO pojawiał się wzrost intensywności fluorescencji ThT oraz włókniste struktury widoczne w AFM; nanocząstki pełniły funkcję miejsc nukleacji poprzez adsorpcję białka i tworzenie tzw. korony białkowej.

- iv. **W pH 4 HCC agregowało spontanicznie, jednak obecność CuO modyfikowała przebieg oraz morfologię powstających struktur.**

ATR-FTIR i nanoIR potwierdziły wzrost udziału struktur β (~44–46%) i spadek struktur α -helikalnych (~26%), natomiast mikroskopia AFM wykazała, że rodzaj i kształt agregatów zależał od stężenia CuO - od form pierścieniowych przy niższych stężeniach po grube fibryle przy wyższych.

- v. **W warunkach mikroprzepływu agregacja HCC zachodziła szybciej i prowadziła do większego zróżnicowania strukturalnego niż w warunkach inkubacji z wytrząsaniem.**

Po 8 godzinach cyrkulacji roztworu białka w chipie mikrofluidycznym widoczne były już włókna w pH 4 i pH 6, a technika nanoIR wykazała szeroki zakres udziału struktur β (15–52%), co świadczy o równoczesnym występowaniu obszarów na różnych etapach dojrzewania agregatów.

- vi. **Analizy SAXS, AFM, ATR-FTIR i nanoIR potwierdziły utratę struktury natywnej HCC i przejście do uporządkowanych form bogatych w elementy β .**

Dane uzyskane metodą SAXS wykazały wzrost promienia żyracji oraz obecność wydłużonych populacji agregatów, natomiast obrazowanie AFM ujawniło zarówno fibryle, jak i kompleksy białko–nanocząstka. Analizy IR (ATR-FTIR i nanoIR) potwierdziły dominację struktur β -arkuszowych oraz reorganizację elementów drugorzędowych, wskazując na zaawansowaną samoorganizację HCC.

- vii. **Powstające agregaty HCC–CuO wykazywały działanie cytotoksyczne oraz indukowały stres oksydacyjny w komórkach.**

Agregaty HCC powstałe w obecności nanocząstek CuO prowadziły do spadku przeżywalności modelowych linii komórek neuroblastomy SH-SY5Y i wzrostu poziomu ROS, mimo że każdy komponent osobno (HCC, CuO NPs) nie wykazywał takiego efektu w zastosowanych stężeniach.

- viii. **Mechanizm oddziaływania HCC z CuO obejmuje kolejno destabilizację struktury białka, adsorpcję na powierzchni nanocząstki, tworzenie miejsc nukleacji, wzrost struktur β i powstawanie agregatów o znaczeniu biologicznym.**

9 Bibliografia

- [1] Nichols E, Steinmetz JD, Vollset SE, et al. Estimation of the global prevalence of dementia in 2019 and forecasted prevalence in 2050: an analysis for the Global Burden of Disease Study 2019. *Lancet Public Health* 2022;7:e105–25. [https://doi.org/10.1016/S2468-2667\(21\)00249-8](https://doi.org/10.1016/S2468-2667(21)00249-8).
- [2] Wang Y, Liang J, Fang Y, et al. Burden of Common Neurologic Diseases in Asian Countries, 1990–2019. *Neurology* 2023;100:E2141–54. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000207218>.
- [3] Alzheimer’s Association. 2017 Alzheimer’s disease facts and figures. *Alzheimers Dement* 2017;13:325–73. <https://doi.org/10.1016/j.jalz.2017.02.001>.
- [4] Knopman DS, Amieva H, Petersen RC, et al. Alzheimer disease. *Nat Rev Dis Primers* 2021;7:33. <https://doi.org/10.1038/s41572-021-00269-y>.
- [5] Poewe W, Seppi K, Tanner CM, et al. Parkinson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2017;3:17013. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.13>.
- [6] Kiernan MC, Vucic S, Cheah BC, et al. Amyotrophic lateral sclerosis. *Lancet* 2011;377:942–55. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61156-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61156-7).
- [7] Bates GP, Dorsey R, Gusella JF, et al. Huntington disease. *Nat Rev Dis Primers* 2015;1:15005. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2015.5>.
- [8] Taylor JP, Hardy J, Fischbeck KH. Toxic Proteins in Neurodegenerative Disease. *Science* 2002;296:1991–5. <https://doi.org/10.1126/science.1067122>.
- [9] Ross CA, Poirier MA. Protein aggregation and neurodegenerative disease. *Nat Med* 2004;10:S10–7. <https://doi.org/10.1038/nm1066>.
- [10] Koo EH, Lansbury PT, Kelly JW. Amyloid diseases: Abnormal protein aggregation in neurodegeneration. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9989–90. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.18.9989>.
- [11] Lansbury PT. Evolution of amyloid: What normal protein folding may tell us about fibrillogenesis and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:3342–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.7.3342>.
- [12] Walsh DM, Lomakin A, Benedek GB, et al. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis. *J Biol Chem* 1997;272:22364–72. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.35.22364>.
- [13] Walsh DM, Hartley DM, Kusumoto Y, et al. Amyloid β -Protein Fibrillogenesis. *J Biol Chem* 1999;274:25945–52. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.36.25945>.
- [14] Conway KA, Lee S-J, Rochet J-C, et al. Acceleration of oligomerization, not fibrillization, is a shared property of both α -synuclein mutations linked to early-onset Parkinson’s disease: Implications for pathogenesis and therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000;97:571–6. <https://doi.org/10.1073/pnas.97.2.571>.
- [15] Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, et al. Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature* 2002;416:507–11. <https://doi.org/10.1038/416507a>.
- [16] Soto C. Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci* 2003;4:49–60. <https://doi.org/10.1038/nrn1007>.

- [17] Dobson CM. Protein-misfolding diseases: Getting out of shape. *Nature* 2002;418:729–30. <https://doi.org/10.1038/418729a>.
- [18] Dobson CM. Protein misfolding, evolution and disease. *Trends Biochem Sci* 1999;24:329–32. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01445-0](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01445-0).
- [19] Stelzmann RA, Norman Schnitzlein H, Reed Murtagh F. An english translation of alzheimer's 1907 paper, "über eine eigenartige erkankung der hirnrinde." *Clin Anat* 1995;8:429–31. <https://doi.org/10.1002/ca.980080612>.
- [20] Leszek J. Choroba Alzheimera - wybrane zagadnienia biologiczne i kliniczne. I. Wrocław: Continuo; 2016.
- [21] Acosta C, Anderson HD, Anderson CM. Astrocyte dysfunction in Alzheimer disease. *J Neurosci Res* 2017;95:2430–47. <https://doi.org/10.1002/jnr.24075>.
- [22] Hardy JA, Higgins GA. Alzheimer's Disease: The Amyloid Cascade Hypothesis. *Science* 1992;256:184–5. <https://doi.org/10.1126/science.1566067>.
- [23] Haass C, Selkoe DJ. Soluble protein oligomers in neurodegeneration: lessons from the Alzheimer's amyloid β -peptide. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:101–12. <https://doi.org/10.1038/nrm2101>.
- [24] Clarke JR, Lyra e Silva NM, Figueiredo CP, et al. Alzheimer-associated A β oligomers impact the central nervous system to induce peripheral metabolic deregulation. *EMBO Mol Med* 2015;7:190–210. <https://doi.org/10.15252/emmm.201404183>.
- [25] Ueberham U, Arendt T. The Expression of Cell Cycle Proteins in Neurons and its Relevance for Alzheimers Disease. *Curr Drug Targets CNS Neurol Disord* 2005;4:293–306. <https://doi.org/10.2174/1568007054038175>.
- [26] Aliev G, Priyadarshini M, Reddy V, et al. Oxidative Stress Mediated Mitochondrial and Vascular Lesions as Markers in the Pathogenesis of Alzheimer Disease. *Curr Med Chem* 2014;21:2208–17. <https://doi.org/10.2174/0929867321666131227161303>.
- [27] Giorgi C, Marchi S, Simoes ICM, et al. Mitochondria and Reactive Oxygen Species in Aging and Age-Related Diseases. *Int Rev Cell Mol Biol* 2018;340:209–344. <https://doi.org/10.1016/bs.ircmb.2018.05.006>.
- [28] Swerdlow RH, Burns JM, Khan SM. The Alzheimer's Disease Mitochondrial Cascade Hypothesis. *J Alzheimers Dis* 2010;20:S265–79. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-100339>.
- [29] Greenberg SM, Bacskai BJ, Hernandez-Guillamon M, et al. Cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer disease — one peptide, two pathways. *Nat Rev Neurol* 2020;16:30–42. <https://doi.org/10.1038/s41582-019-0281-2>.
- [30] Członkowska A, Litwin T, Dusek P, et al. Wilson disease. *Nat Rev Dis Primers* 2018;4:21. <https://doi.org/10.1038/s41572-018-0018-3>.
- [31] Schaffer Aguzzoli C, Ferreira PCL, Povala G, et al. Neuropsychiatric Symptoms and Microglial Activation in Patients with Alzheimer Disease. *JAMA Netw Open* 2023;6:e2345175. <https://doi.org/10.1001/jamanetworkopen.2023.45175>.
- [32] Solanki R, Karande A, Ranganathan P. Emerging role of gut microbiota dysbiosis in neuroinflammation and neurodegeneration. *Front Neurol* 2023;14:1149618. <https://doi.org/10.3389/fneur.2023.1149618>.

- [33] Hassamal S. Chronic stress, neuroinflammation, and depression: an overview of pathophysiological mechanisms and emerging anti-inflammatories. *Front Psychiatry* 2023;14:1130989. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1130989>.
- [34] Miller AA, Spencer SJ. Obesity and neuroinflammation: A pathway to cognitive impairment. *Brain Behav Immun* 2014;42:10–21. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2014.04.001>.
- [35] Costa LG, Cole TB, Dao K, et al. Neurotoxicity of air pollution: Role of neuroinflammation. *Adv Neurotoxicol* 2019;3:195–221. <https://doi.org/10.1016/bs.ant.2018.10.007>.
- [36] Block ML, Calderón-Garcidueñas L. Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci* 2009;32:506–16. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2009.05.009>.
- [37] Hahad O, Bayo Jimenez MT, Kuntic M, et al. Cerebral consequences of environmental noise exposure. *Environ Int* 2022;165:107306. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2022.107306>.
- [38] Lahiri DK, Maloney B. The “LEARn” (Latent Early-life Associated Regulation) model integrates environmental risk factors and the developmental basis of Alzheimer’s disease, and proposes remedial steps. *Exp Gerontol* 2010;45:291–6. <https://doi.org/10.1016/j.exger.2010.01.001>.
- [39] Livingston G, Huntley J, Sommerlad A, et al. Dementia prevention, intervention, and care: 2020 report of the Lancet Commission. *Lancet* 2020;396:413–46. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30367-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30367-6).
- [40] Birmili W, Allen AG, Bary F, et al. Trace Metal Concentrations and Water Solubility in Size-Fractionated Atmospheric Particles and Influence of Road Traffic. *Environ Sci Technol* 2006;40:1144–53. <https://doi.org/10.1021/es0486925>.
- [41] Zhou P, Guo J, Zhou X, et al. PM_{2.5}, PM₁₀ and health risk assessment of heavy metals in a typical printed circuit boards manufacturing workshop. *J Environ Sci* 2014;26:2018–26. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.08.003>.
- [42] Hu X, Zhang Y, Ding Z, et al. Bioaccessibility and health risk of arsenic and heavy metals (Cd, Co, Cr, Cu, Ni, Pb, Zn and Mn) in TSP and PM_{2.5} in Nanjing, China. *Atmos Environ* 2012;57:146–52. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2012.04.056>.
- [43] Chen Y-C, Hsu C-Y, Lin S-L, et al. Characteristics of Concentrations and Metal Compositions for PM_{2.5} and PM_{2.5-10} in Yunlin County, Taiwan during Air Quality Deterioration. *Aerosol Air Qual Res* 2015;15:2571–83. <https://doi.org/10.4209/aaqr.2015.04.0261>.
- [44] Zhang D, Li H, Luo X-S, et al. Toxicity assessment and heavy metal components of inhalable particulate matters (PM_{2.5} & PM₁₀) during a dust storm invading the city. *Process Saf Environ Prot* 2022;162:859–66. <https://doi.org/10.1016/j.psep.2022.04.065>.
- [45] Makkonen U, Vestenius M, Huy LN, et al. Chemical composition and potential sources of PM_{2.5} in Hanoi. *Atmos Environ* 2023;299:119650. <https://doi.org/10.1016/j.atmosenv.2023.119650>.

- [46] Lee S, Han C, Ahn J, et al. Characterization of trace elements and Pb isotopes in PM_{2.5} and isotopic source identification during haze episodes in Seoul, Korea. *Atmos Pollut Res* 2022;13:101442. <https://doi.org/10.1016/j.apr.2022.101442>.
- [47] Juda-Rezler K, Reizer M, Maciejewska K, et al. Characterization of atmospheric PM_{2.5} sources at a Central European urban background site. *Sci Total Environ* 2020;713:136729. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2020.136729>.
- [48] EEA Report No 10/2019. Air quality in Europe — 2019 report. 2019. <https://doi.org/doi:10.2800/822355>.
- [49] EEA Report No 09/2020. Air quality in Europe — 2020 report. 2020. <https://doi.org/doi:10.2800/786656>.
- [50] Targa J, Colina M, Banyuls L, et al. Status report of air quality in Europe for year 2024, using validated and up-to-date data (ETC-HE Report 2025/1). 2024. <https://doi.org/10.5281/zenodo.15168515>.
- [51] Premature deaths due to exposure to fine particulate matter in Europe. European Environment Agency (EEA). European Environment Agency's home page. n.d. <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/indicators/health-impacts-of-exposure-to> (accessed April 16, 2025).
- [52] Air quality status report 2025. European Environment Agency (EEA). European Environment Agency's home page. n.d. <https://www.eea.europa.eu/en/analysis/publications/air-quality-status-report-2025> (accessed April 16, 2025).
- [53] Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al. Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain. *Inhal Toxicol* 2004;16:437–45. <https://doi.org/10.1080/08958370490439597>.
- [54] Wang B, Feng WY, Wang M, et al. Transport of Intranasally Instilled Fine Fe₂O₃ Particles into the Brain: Micro-distribution, Chemical States, and Histopathological Observation. *Biol Trace Elem Res* 2007;118:233–43. <https://doi.org/10.1007/s12011-007-0028-6>.
- [55] Wang J, Liu Y, Jiao F, et al. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO₂ nanoparticles. *Toxicology* 2008;254:82–90. <https://doi.org/10.1016/j.tox.2008.09.014>.
- [56] Manuja A, Kumar B, Kumar R, et al. Metal/metal oxide nanoparticles: Toxicity concerns associated with their physical state and remediation for biomedical applications. *Toxicol Rep* 2021;8:1970–8. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.11.020>.
- [57] Naz S, Gul A, Zia M. Toxicity of copper oxide nanoparticles: a review study. *IET Nanobiotechnol* 2020;14:1–13. <https://doi.org/10.1049/iet-nbt.2019.0176>.
- [58] Gatoo MA, Naseem S, Arfat MY, et al. Physicochemical Properties of Nanomaterials: Implication in Associated Toxic Manifestations. *Biomed Res Int* 2014;2014:1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/498420>.
- [59] Chen Z, Meng H, Xing G, et al. Acute toxicological effects of copper nanoparticles in vivo. *Toxicol Lett* 2006;163:109–20. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2005.10.003>.

- [60] Baek Y-W, An Y-J. Microbial toxicity of metal oxide nanoparticles (CuO, NiO, ZnO, and Sb₂O₃) to *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, and *Streptococcus aureus*. *Sci Total Environ* 2011;409:1603–8. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2011.01.014>.
- [61] Mashock MJ, Kappell AD, Hallaj N, et al. Copper oxide nanoparticles inhibit the metabolic activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Environ Toxicol Chem* 2015;35:134–43. <https://doi.org/10.1002/etc.3159>.
- [62] Mashock MJ, Zanon T, Kappell AD, et al. Copper Oxide Nanoparticles Impact Several Toxicological Endpoints and Cause Neurodegeneration in *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One* 2016;11:e0167613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0167613>.
- [63] Guo H, Ouyang Y, Yin H, et al. Induction of autophagy via the ROS-dependent AMPK-mTOR pathway protects copper-induced spermatogenesis disorder. *Redox Biol* 2022;49:102227. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102227>.
- [64] Yang F, Liao J, Yu W, et al. Exposure to copper induces mitochondria-mediated apoptosis by inhibiting mitophagy and the PINK1/parkin pathway in chicken (*Gallus gallus*) livers. *J Hazard Mater* 2021;408:124888. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2020.124888>.
- [65] Bayramoglu Akkoyun M, Temel Y, Bengü AŞ, et al. Ameliorative effects of astaxanthin against copper(II) ion-induced alteration of pentose phosphate pathway and antioxidant system enzymes in rats. *Environ Sci Pollut Res* 2021;28:62919–26. <https://doi.org/10.1007/s11356-021-15017-8>.
- [66] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins. *Science* 2022;375:1254–61. <https://doi.org/10.1126/science.abf0529>.
- [67] Fahmy HM, Ebrahim NM, Gaber MH. In-vitro evaluation of copper/copper oxide nanoparticles cytotoxicity and genotoxicity in normal and cancer lung cell lines. *J Trace Elem Med Biol* 2020;60:126481. <https://doi.org/10.1016/j.jtemb.2020.126481>.
- [68] Siddiquee MdA, Parray M ud din, Kamli MR, et al. Biogenic synthesis, in-vitro cytotoxicity, esterase activity and interaction studies of copper oxide nanoparticles with lysozyme. *J Mater Res Technol* 2021;13:2066–77. <https://doi.org/10.1016/j.jmrt.2021.05.078>.
- [69] Henson TE, Navratilova J, Tennant AH, et al. *In vitro* intestinal toxicity of copper oxide nanoparticles in rat and human cell models. *Nanotoxicology* 2019;13:795–811. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1578428>.
- [70] Zuily L, Lahrach N, Fassler R, et al. Copper Induces Protein Aggregation, a Toxic Process Compensated by Molecular Chaperones. *MBio* 2022;13. <https://doi.org/10.1128/mbio.03251-21>.
- [71] Holmes AM, Mackenzie L, Roberts MS. Disposition and measured toxicity of zinc oxide nanoparticles and zinc ions against keratinocytes in cell culture and viable human epidermis. *Nanotoxicology* 2020;14:263–74. <https://doi.org/10.1080/17435390.2019.1692382>.

- [72] Miri A, Mahdinejad N, Ebrahimi O, et al. Zinc oxide nanoparticles: Biosynthesis, characterization, antifungal and cytotoxic activity. *Mater Sci Eng C* 2019;104:109981. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109981>.
- [73] Tetey CO, Shin HM. Evaluation of the antioxidant and cytotoxic activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using *scutellaria baicalensis* root. *Sci Afr* 2019;6:e00157. <https://doi.org/10.1016/j.sciaf.2019.e00157>.
- [74] Chen P, Wang H, He M, et al. Size-dependent cytotoxicity study of ZnO nanoparticles in HepG2 cells. *Ecotoxicol Environ Saf* 2019;171:337–46. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.12.096>.
- [75] Pinho AR, Martins F, Costa ME V., et al. In Vitro Cytotoxicity Effects of Zinc Oxide Nanoparticles on Spermatogonia Cells. *Cells* 2020;9:1081. <https://doi.org/10.3390/cells9051081>.
- [76] Selim YA, Azb MA, Ragab I, et al. Green Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles Using Aqueous Extract of *Deverra tortuosa* and their Cytotoxic Activities. *Sci Rep* 2020;10:3445. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-60541-1>.
- [77] Ahmad J, Wahab R, Siddiqui MA, et al. Cytotoxicity and cell death induced by engineered nanostructures (quantum dots and nanoparticles) in human cell lines. *J Biol Inorg Chem* 2020;25:325–38. <https://doi.org/10.1007/s00775-020-01764-5>.
- [78] Li Y, Yang C, Wang S, et al. Copper and iron ions accelerate the prion-like propagation of α -synuclein: A vicious cycle in Parkinson's disease. *Int J Biol Macromol* 2020;163:562–73. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.06.274>.
- [79] Li X, Du X, Ni J. Zn²⁺ Aggravates Tau Aggregation and Neurotoxicity. *Int J Mol Sci* 2019;20:487. <https://doi.org/10.3390/ijms20030487>.
- [80] Moreira GG, Cristóvão JS, Torres VM, et al. Zinc Binding to Tau Influences Aggregation Kinetics and Oligomer Distribution. *Int J Mol Sci* 2019;20:5979. <https://doi.org/10.3390/ijms20235979>.
- [81] Du Z, Chai X, Li X, et al. Nano-CuO causes cell damage through activation of dose-dependent autophagy and mitochondrial IncCyt b-AS/ND5-AS/ND6-AS in SH-SY5Y cells. *Toxicol Mech Methods* 2022;32:37–48. <https://doi.org/10.1080/15376516.2021.1964665>.
- [82] Koca FD, Ünal G, Halici MG. Lichen Based Synthesis of Zinc Oxide Nanoparticles and Evaluation of its Neurotoxic Effects on Human Neuroblastoma Cells. *J Nano Res* 2019;59:15–24. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/JNanoR.59.15>.
- [83] Liu J, Kang Y, Yin S, et al. Zinc oxide nanoparticles induce toxic responses in human neuroblastoma SHSY5Y cells in a size-dependent manner. *Int J Nanomedicine* 2017;12:8085–99. <https://doi.org/10.2147/IJN.S149070>.
- [84] Xiang B, Li D, Chen Y, et al. Curcumin Ameliorates Copper-Induced Neurotoxicity Through Inhibiting Oxidative Stress and Mitochondrial Apoptosis in SH-SY5Y Cells. *Neurochem Res* 2021;46:367–78. <https://doi.org/10.1007/s11064-020-03173-1>.
- [85] Shi Y, Pillozzi AR, Huang X. Exposure of CuO Nanoparticles Contributes to Cellular Apoptosis, Redox Stress, and Alzheimer's A β Amyloidosis. *Int J Environ Res Public Health* 2020;17:1005. <https://doi.org/10.3390/ijerph17031005>.

- [86] Carey IM, Anderson HR, Atkinson RW, et al. Are noise and air pollution related to the incidence of dementia? A cohort study in London, England. *BMJ Open* 2018;8:e022404. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2018-022404>.
- [87] Weuve J. Exposure to Particulate Air Pollution and Cognitive Decline in Older Women. *Arch Intern Med* 2012;172:219. <https://doi.org/10.1001/archinternmed.2011.683>.
- [88] Ranft U, Schikowski T, Sugiri D, et al. Long-term exposure to traffic-related particulate matter impairs cognitive function in the elderly. *Environ Res* 2009;109:1004–11. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2009.08.003>.
- [89] Jung C-R, Lin Y-T, Hwang B-F. Ozone, Particulate Matter, and Newly Diagnosed Alzheimer's Disease: A Population-Based Cohort Study in Taiwan. *J Alzheimers Dis* 2015;44:573–84. <https://doi.org/10.3233/JAD-140855>.
- [90] Mork D, Braun D, Zanobetti A. Time-lagged relationships between a decade of air pollution exposure and first hospitalization with Alzheimer's disease and related dementias. *Environ Int* 2023;171:107694. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2022.107694>.
- [91] Zhang B, Weuve J, Langa KM, et al. Comparison of Particulate Air Pollution From Different Emission Sources and Incident Dementia in the US. *JAMA Intern Med* 2023;183:1080–9. <https://doi.org/10.1001/JAMAINTERNMED.2023.3300>.
- [92] Mortamais M, Gutierrez LA, de Hoogh K, et al. Long-term exposure to ambient air pollution and risk of dementia: Results of the prospective Three-City Study. *Environ Int* 2021;148:106376. <https://doi.org/10.1016/J.ENVINT.2020.106376>.
- [93] Shi L, Steenland K, Li H, et al. A national cohort study (2000–2018) of long-term air pollution exposure and incident dementia in older adults in the United States. *Nat Commun* 2021;12:1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-27049-2>.
- [94] Zhang Z, Chen L, Wang X, et al. Associations of Air Pollution and Genetic Risk With Incident Dementia: A Prospective Cohort Study. *Am J Epidemiol* 2023;192:182–94. <https://doi.org/10.1093/AJE/KWAC188>.
- [95] Grande G, Ljungman PLS, Eneroth K, et al. Association Between Cardiovascular Disease and Long-term Exposure to Air Pollution With the Risk of Dementia. *JAMA Neurol* 2020;77:801–9. <https://doi.org/10.1001/JAMANEUROL.2019.4914>.
- [96] Wu QZ, Zeng HX, Andersson J, et al. Long-term exposure to major constituents of fine particulate matter and neurodegenerative diseases: A population-based survey in the Pearl River Delta Region, China. *J Hazard Mater* 2024;470:134161. <https://doi.org/10.1016/J.JHAZMAT.2024.134161>.
- [97] Peters S, Bouma F, Hoek G, et al. Air pollution exposure and mortality from neurodegenerative diseases in the Netherlands: A population-based cohort study. *Environ Res* 2024;259:119552. <https://doi.org/10.1016/J.ENVRES.2024.119552>.
- [98] Ge R, Wang Y, Zhang Z, et al. Association of long-term exposure to various ambient air pollutants, lifestyle, and genetic predisposition with incident cognitive impairment and dementia. *BMC Public Health* 2024;24:179. <https://doi.org/10.1186/s12889-024-17702-y>.

- [99] Puckett OK, Fennema-Notestine C, Hagler DJ, et al. The Association between Exposure to Fine Particulate Matter and MRI-Assessed Locus Coeruleus Integrity in the Vietnam Era Twin Study of Aging (VETSA). *Environ Health Perspect* 2024;132:077006-1-077006–8. <https://doi.org/10.1289/EHP14344>.
- [100] Iaccarino L, La Joie R, Lesman-Segev OH, et al. Association Between Ambient Air Pollution and Amyloid Positron Emission Tomography Positivity in Older Adults With Cognitive Impairment. *JAMA Neurol* 2021;78:197. <https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2020.3962>.
- [101] Alemany S, Crous-Bou M, Vilor-Tejedor N, et al. Associations between air pollution and biomarkers of Alzheimer’s disease in cognitively unimpaired individuals. *Environ Int* 2021;157:106864. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2021.106864>.
- [102] Falcón C, Gascon M, Molinuevo JL, et al. Brain correlates of urban environmental exposures in cognitively unimpaired individuals at increased risk for Alzheimer’s disease: A study on Barcelona’s population. *Alzheimers Dementia (Amst)* 2021;13:e12205. <https://doi.org/10.1002/dad2.12205>.
- [103] Hajat A, Park C, Adam C, et al. Air pollution and plasma amyloid beta in a cohort of older adults: Evidence from the Ginkgo Evaluation of Memory study. *Environ Int* 2023;172:107800. <https://doi.org/10.1016/j.envint.2023.107800>.
- [104] Casey E, Li Z, Liang D, et al. Association between Fine Particulate Matter Exposure and Cerebrospinal Fluid Biomarkers of Alzheimer’s Disease among a Cognitively Healthy Population-Based Cohort. *Environ Health Perspect* 2024;132. <https://doi.org/10.1289/EHP13503>.
- [105] Calderón-Garcidueñas L, González-Maciel A, Reynoso-Robles R, et al. Alzheimer’s disease and alpha-synuclein pathology in the olfactory bulbs of infants, children, teens and adults ≤ 40 years in Metropolitan Mexico City. APOE4 carriers at higher risk of suicide accelerate their olfactory bulb pathology. *Environ Res* 2018;166:348–62. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2018.06.027>.
- [106] Shaffer RM, Li G, Adar SD, et al. Fine Particulate Matter and Markers of Alzheimer’s Disease Neuropathology at Autopsy in a Community-Based Cohort. *J Alzheimers Dis* 2021;79:1761–73. <https://doi.org/10.3233/JAD-201005>.
- [107] Calderón-Garcidueñas L, Stommel EW, Torres-Jardón R, et al. Alzheimer and Parkinson diseases, frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis overlapping neuropathology start in the first two decades of life in pollution exposed urbanites and brain ultrafine particulate matter and industrial nanoparticles, including Fe, Ti, Al, V, Ni, Hg, Co, Cu, Zn, Ag, Pt, Ce, La, Pr and W are key players. Metropolitan Mexico City health crisis is in progress. *Front Hum Neurosci* 2024;17. <https://doi.org/10.3389/fnhum.2023.1297467>.
- [108] Calderón-Garcidueñas L, Stommel EW, Lachmann I, et al. TDP-43 CSF Concentrations Increase Exponentially with Age in Metropolitan Mexico City Young Urbanites Highly Exposed to PM2.5 and Ultrafine Particles and Historically Showing Alzheimer and Parkinson’s Hallmarks. Brain TDP-43 Pathology in MMC Residents Is Associated with High Cisternal CSF TDP-43 Concentrations. *Toxics* 2022;10:559. <https://doi.org/10.3390/toxics10100559>.

- [109] Herr D, Jew K, Wong C, et al. Effects of concentrated ambient ultrafine particulate matter on hallmarks of Alzheimer's disease in the 3xTgAD mouse model. *Neurotoxicology* 2021;84:172–83. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2021.03.010>.
- [110] Peters A, Veronesi B, Calderón-Garcidueñas L, et al. Translocation and potential neurological effects of fine and ultrafine particles a critical update. Part Fibre Toxicol 2006;3:1–13. <https://doi.org/10.1186/1743-8977-3-13>.
- [111] Zhu Q, Deng Y-L, Liu Y, et al. Associations between Ultrafine Particles and Incident Dementia in Older Adults. *Environ Sci Technol* 2025;59:5443–51. <https://doi.org/10.1021/acs.est.4c10574>.
- [112] Flood-Garibay JA, Angulo-Molina A, Méndez-Rojas MÁ. Particulate matter and ultrafine particles in urban air pollution and their effect on the nervous system. *Environ Sci Process Impacts* 2023;25:704–26. <https://doi.org/10.1039/D2EM00276K>.
- [113] Cory-Slechta DA, Merrill A, Sobolewski M. Air Pollution–Related Neurotoxicity Across the Life Span. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2023;63:143–63. <https://doi.org/10.1146/annurev-pharmtox-051921-020812>.
- [114] Clausen J. Proteins in Normal Cerebrospinal Fluid Not Found in Serum. *Exp Biol Med* 1961;107:170–2. <https://doi.org/10.3181/00379727-107-26569>.
- [115] Barrett AJ. Cystatin, the egg white inhibitor of cysteine proteinases. *Methods Enzymol* 1981;80:771–8. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(81\)80059-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(81)80059-6).
- [116] Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, et al. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. *Biochem J* 1986;236:312–312. <https://doi.org/10.1042/bj2360312>.
- [117] Barrett AJ. The cystatins: a diverse superfamily of cysteine peptidase inhibitors. *Biomed Biochim Acta* 1986;45:1363–74.
- [118] Rawlings ND, Barrett AJ. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. *J Mol Evol* 1990;30:60–71. <https://doi.org/10.1007/BF02102453>.
- [119] Mussap M, Plebani M. Biochemistry and Clinical Role of Human Cystatin C. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004;41:467–550. <https://doi.org/10.1080/10408360490504934>.
- [120] Ochieng J, Chaudhuri G. Cystatin Superfamily. *J Health Care Poor Underserved* 2010;21:51–70. <https://doi.org/10.1353/hpu.0.0257>.
- [121] Grubb A, Löfberg H. Human gamma-trace, a basic microprotein: amino acid sequence and presence in the adenohypophysis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1982;79:3024–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.79.9.3024>.
- [122] Abrahamson M. Cystatins. *Methods Enzymol* 1994;244:685–700. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(94\)44051-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(94)44051-4).
- [123] Alvarez-Fernandez M, Barrett AJ, Gerhartz B, et al. Inhibition of Mammalian Legumain by Some Cystatins Is Due to a Novel Second Reactive Site. *J Biol Chem* 1999;274:19195–203. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.27.19195>.
- [124] Bode W, Engh R, Musil D, et al. The 2.0 Å X-ray crystal structure of chicken egg white cystatin and its possible mode of interaction with cysteine proteinases. *EMBO J* 1988;7:2593–9. <https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1988.tb03109.x>.

- [125] Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, et al. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J* 2010;277:1726–37. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07596.x>.
- [126] Abrahamson M, Barrett AJ, Salvesen G, et al. Isolation of six cysteine proteinase inhibitors from human urine. Their physicochemical and enzyme kinetic properties and concentrations in biological fluids. *J Biol Chem* 1986;261:11282–9. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)67380-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)67380-6).
- [127] Håkansson K, Huh C, Grubb A, et al. Mouse and rat cystatin C: *Escherichia coli* production, characterization and tissue distribution. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 1996;114:303–11. [https://doi.org/10.1016/0305-0491\(96\)00025-9](https://doi.org/10.1016/0305-0491(96)00025-9).
- [128] Yasuhara O, Hanai K, Ohkubo I, et al. Expression of cystatin C in rat, monkey and human brains. *Brain Res* 1993;628:85–92. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(93\)90941-F](https://doi.org/10.1016/0006-8993(93)90941-F).
- [129] Palm DE, Knuckey NW, Primiano MJ, et al. Cystatin C, a protease inhibitor, in degenerating rat hippocampal neurons following transient forebrain ischemia. *Brain Res* 1995;691:1–8. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(95\)00520-Z](https://doi.org/10.1016/0006-8993(95)00520-Z).
- [130] Toshihiko Miyake, Yoshinari Gahara, Manabu Nakayama, et al. Up-regulation of cystatin C by microglia in the rat facial nucleus following axotomy. *Mol Brain Res* 1996;37:273–82. [https://doi.org/10.1016/0169-328X\(95\)00337-R](https://doi.org/10.1016/0169-328X(95)00337-R).
- [131] Zou J, Chen Z, Wei X, et al. Cystatin C as a potential therapeutic mediator against Parkinson's disease via VEGF-induced angiogenesis and enhanced neuronal autophagy in neurovascular units. *Cell Death Dis* 2017;8:e2854–e2854. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.240>.
- [132] Grubb AO. Cystatin C-Properties and use as diagnostic marker. *Adv Clin Chem* 2001;35:63–99. [https://doi.org/10.1016/S0065-2423\(01\)35015-1](https://doi.org/10.1016/S0065-2423(01)35015-1).
- [133] Maniwa K, Yano S, Sheikh AMd, et al. Association between cystatin C gene polymorphism and the prevalence of white matter lesion in elderly healthy subjects. *Sci Rep* 2020;10:4688. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-61383-7>.
- [134] Turk V, Bode W. The cystatins: Protein inhibitors of cysteine proteinases. *FEBS Lett* 1991;285:213–9. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(91\)80804-C](https://doi.org/10.1016/0014-5793(91)80804-C).
- [135] Kaur G, Levy E. Cystatin C in Alzheimer's disease. *Front Mol Neurosci* 2012;5:27334. <https://doi.org/10.3389/fnmol.2012.00079>.
- [136] Grubb A, Simonsen O, Sturfelt G, et al. Serum Concentration of Cystatin C, Factor D and β 2-Microglobulin as a Measure of Glomerular Filtration Rate. *Acta Med Scand* 1985;218:499–503. <https://doi.org/10.1111/j.0954-6820.1985.tb08880.x>.
- [137] Keppler D. Towards novel anti-cancer strategies based on cystatin function. *Cancer Lett* 2006;235:159–76. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2005.04.001>.
- [138] Luo J, Wang L-P, Hu H-F, et al. Cystatin C and cardiovascular or all-cause mortality risk in the general population: A meta-analysis. *Clinica Chimica Acta* 2015;450:39–45. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2015.07.016>.
- [139] Dunaieva IP. Cystatin C improves cardiovascular risk prediction in cardiometabolic patients in addition to estimated glomerular filtration rate. *Arter Hypertens* 2024;28:39–45. <https://doi.org/10.5603/ah.97394>.

- [140] Muslimovic A, Tulumovic D, Hasanspahic S, et al. Serum Cystatin C - Marker of Inflammation and Cardiovascular Morbidity in Chronic Kidney Disease Stages 1-4. *Materia Socio Medica* 2015;27:75. <https://doi.org/10.5455/msm.2015.27.75-78>.
- [141] Mares J, Stejskal D, Vavrousková J, et al. Use of cystatin C determination in clinical diagnostics. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 2003;147:177–80. <https://doi.org/10.5507/BP.2003.025>.
- [142] Zhang M, Li Y, Yang X, et al. Serum Cystatin C as an Inflammatory Marker in Exacerbated and Convalescent COPD Patients. *Inflammation* 2016;39:625–31. <https://doi.org/10.1007/s10753-015-0287-x>.
- [143] Huang C, Lu J, Yang J, et al. Associations of serum cystatin C concentrations with total mortality and mortality of 12 site-specific cancers. *Front Mol Biosci* 2024;11:1209349. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2024.1209349>.
- [144] Ding L, Liu Z, Wang J. Role of cystatin C in urogenital malignancy. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2022;13:1082871. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1082871>.
- [145] Jones M, Denieffe S, Griffin C, et al. Evaluation of cystatin C in malignancy and comparability of estimates of GFR in oncology patients. *Pract Lab Med* 2017;8:95–104. <https://doi.org/10.1016/j.plabm.2017.05.005>.
- [146] Leto G, Crescimanno M, Flandina C. On the role of cystatin C in cancer progression. *Life Sci* 2018;202:152–60. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2018.04.013>.
- [147] Warfel AH, Cardozo C, Yoo OH, et al. Cystatin C and Cathepsin B Production by Alveolar Macrophages From Smokers and Nonsmokers. *J Leukoc Biol* 1991;49:41–7. <https://doi.org/10.1002/jlb.49.1.41>.
- [148] Beyer K, Lao JI, Gómez M, et al. Alzheimer’s disease and the cystatin C gene polymorphism: an association study. *Neurosci Lett* 2001;315:17–20. [https://doi.org/10.1016/S0304-3940\(01\)02307-2](https://doi.org/10.1016/S0304-3940(01)02307-2).
- [149] Deng A, Irizarry MC, Nitsch RM, et al. Elevation of Cystatin C in Susceptible Neurons in Alzheimer’s Disease. *Am J Pathol* 2001;159:1061–8. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)61781-6](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)61781-6).
- [150] Roks G, Cruts M, Slooter AJC, et al. The cystatin C polymorphism is not associated with early onset Alzheimer’s disease. *Neurology* 2001;57:366–7. <https://doi.org/10.1212/WNL.57.2.366-a>.
- [151] Mathews PM, Levy E. Cystatin C in aging and in Alzheimer’s disease. *Ageing Res Rev* 2016;32:38–50. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2016.06.003>.
- [152] Wilson ME, Boumaza I, Lacomis D, et al. Cystatin C: A Candidate Biomarker for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *PLoS One* 2010;5:e15133. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015133>.
- [153] Hu WD, Chen J, Mao CJ, et al. Elevated Cystatin C Levels Are Associated with Cognitive Impairment and Progression of Parkinson Disease. *Cogn Behav Neurol* 2016;29:144–9. <https://doi.org/10.1097/WNN.0000000000000100>.
- [154] Pirttilä TJ, Manninen A, Juttila L, et al. Cystatin C expression is associated with granule cell dispersion in epilepsy. *Ann Neurol* 2005;58:211–23. <https://doi.org/10.1002/ana.20545>.

- [155] Kaur G, Mohan P, Pawlik M, et al. Cystatin C Rescues Degenerating Neurons in a Cystatin B-Knockout Mouse Model of Progressive Myoclonus Epilepsy. *Am J Pathol* 2010;177:2256–67. <https://doi.org/10.2353/ajpath.2010.100461>.
- [156] Abrahamson M, Ritonja A, Brown MA, et al. Identification of the probable inhibitory reactive sites of the cysteine proteinase inhibitors human cystatin C and chicken cystatin. *J Biol Chem* 1987;262:9688–94. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47989-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47989-6).
- [157] Janowski R, Kozak M, Jankowska E, et al. Human cystatin C, an amyloidogenic protein, dimerizes through three-dimensional domain swapping. *Nat Struct Biol* 2001;8:316–20. <https://doi.org/10.1038/86188>.
- [158] Bennett MJ, Schlunegger MP, Eisenberg D. 3D domain swapping: A mechanism for oligomer assembly. *Protein Sci* 1995;4:2455–68. <https://doi.org/10.1002/pro.5560041202>.
- [159] Liu Y, Eisenberg D. 3D domain swapping: As domains continue to swap. *Protein Sci* 2002;11:1285–99. <https://doi.org/10.1110/ps.0201402>.
- [160] Taube M, Pietralik Z, Szymanska A, et al. The domain swapping of human cystatin C induced by synchrotron radiation. *Sci Rep* 2019;9:8548. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44811-1>.
- [161] Kozak M, Jankowska E, Janowski R, et al. Expression of a selenomethionyl derivative and preliminary crystallographic studies of human cystatin C. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 1999;55:1939–42. <https://doi.org/10.1107/S090744449901121X>.
- [162] Janowski R, Kozak M, Abrahamson M, et al. 3D domain-swapped human cystatin C with amyloidlike intermolecular β -sheets. *Proteins* 2005;61:570–8. <https://doi.org/10.1002/prot.20633>.
- [163] Abrahamson M, Grubb A. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68-->Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1416–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1416>.
- [164] Chrabaszczewska M, Maszota-Zieleniak M, Pietralik Z, et al. Cyclic trimer of human cystatin C, an amyloidogenic protein - molecular dynamics and experimental studies. *J Appl Phys* 2018;123. <https://doi.org/10.1063/1.5023807>.
- [165] Wojciechowska D, Taube M, Rucińska K, et al. Oligomerization of Human Cystatin C—An Amyloidogenic Protein: An Analysis of Small Oligomeric Subspecies. *Int J Mol Sci* 2022;23:13441. <https://doi.org/10.3390/ijms232113441>.
- [166] Maszota-Zieleniak M, Jurczak P, Orlikowska M, et al. NMR and crystallographic structural studies of the extremely stable monomeric variant of human cystatin C with single amino acid substitution. *FEBS J* 2020;287:361–76. <https://doi.org/10.1111/febs.15010>.
- [167] Orlikowska M, Jankowska E, Kołodziejczyk R, et al. Hinge-loop mutation can be used to control 3D domain swapping and amyloidogenesis of human cystatin C. *J Struct Biol* 2011;173:406–13. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2010.11.009>.

- [168] Kolodziejczyk R, Michalska K, Hernandez-Santoyo A, et al. Crystal structure of human cystatin C stabilized against amyloid formation. *FEBS J* 2010;277:1726–37. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2010.07596.x>.
- [169] Perlenfein TJ, Mehlhoff JD, Murphy RM. Insights into the mechanism of cystatin C oligomer and amyloid formation and its interaction with β -amyloid. *J Biol Chem* 2017;292:11485–98. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.786558>.
- [170] Wahlbom M, Wang X, Lindström V, et al. Fibrillogenic Oligomers of Human Cystatin C Are Formed by Propagated Domain Swapping. *J Biol Chem* 2007;282:18318–26. <https://doi.org/10.1074/jbc.M611368200>.
- [171] Tsiolaki PL, Hamodrakas SJ, Iconomidou VA. The pentapeptide LQVVR plays a pivotal role in human cystatin C fibrillization. *FEBS Lett* 2015;589:159–64. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.11.041>.
- [172] Tsiolaki PL, Louros NN, Hamodrakas SJ, et al. Exploring the ‘aggregation-prone’ core of human Cystatin C: A structural study. *J Struct Biol* 2015;191:272–80. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2015.07.013>.
- [173] Ghiso J, Jansson O, Frangione B. Amyloid fibrils in hereditary cerebral hemorrhage with amyloidosis of Icelandic type is a variant of gamma-trace basic protein (cystatin C). *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:2974–8. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.9.2974>.
- [174] Abrahamson M, Grubb A. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68->Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1416–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1416>.
- [175] Gerhartz B, Ekiel I, Abrahamson M. Two Stable Unfolding Intermediates of the Disease-Causing L68Q Variant of Human Cystatin C. *Biochemistry* 1998;37:17309–17. <https://doi.org/10.1021/bi980873u>.
- [176] Jansson O, Gudmundsson G, Arnason A, et al. Hereditary cystatin C (γ -trace) amyloid angiopathy of the CNS causing cerebral hemorrhage. *Acta Neurol Scand* 1987;76:102–14. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0404.1987.tb03553.x>.
- [177] Palsdottir A, Thorsteinsson L, Olafsson I, et al. Mutation in cystatin C gene causes hereditary brain haemorrhage. *Lancet* 1988;332:603–4. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(88\)90641-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(88)90641-1).
- [178] Ghiso J, Pons-Estel B, Frangione B. Hereditary Cerebral Amyloid Angiopathy: The amyloid fibrils contain a protein which is a variant of Cystatin C, an inhibitor of lysosomal cysteine proteases. *Biochem Biophys Res Commun* 1986;136:548–54. [https://doi.org/10.1016/0006-291X\(86\)90475-4](https://doi.org/10.1016/0006-291X(86)90475-4).
- [179] Palsdottir A, Snorraddottir AO, Thorsteinsson L. Hereditary Cystatin C Amyloid Angiopathy: Genetic, Clinical, and Pathological Aspects. *Brain Pathology* 2006;16:55–9. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2006.tb00561.x>.
- [180] Gerhartz B, Abrahamson M. Physico-Chemical Properties of the N-Terminally Truncated L68Q Cystatin C Found in Amyloid Deposits of Brain Haemorrhage Patients. *Biol Chem* 2002;383:301–5. <https://doi.org/10.1515/BC.2002.032>.

- [181] Bjarnadottir M, Nilsson C, Lindstrom V, et al. The cerebral hemorrhage-producing cystatin C variant (L68Q) in extracellular fluids. *Amyloid* 2001;8:1–10. <https://doi.org/10.3109/13506120108993809>.
- [182] Wei L, Berman Y, Castaño EM, et al. Instability of the Amyloidogenic Cystatin C Variant of Hereditary Cerebral Hemorrhage with Amyloidosis, Icelandic Type. *J Biol Chem* 1998;273:11806–14. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.19.11806>.
- [183] Benedikz E, Blöndal H, Gudmundsson G. Skin deposits in hereditary cystatin C amyloidosis. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1990;417:325–31. <https://doi.org/10.1007/BF01605784>.
- [184] Osredkar J. Copper and Zinc, Biological Role and Significance of Copper/Zinc Imbalance. *J Clin Toxicol* 2011;s3:3. <https://doi.org/10.4172/2161-0495.S3-001>.
- [185] Cicero CE, Mostile G, Vasta R, et al. Metals and neurodegenerative diseases. A systematic review. *Environ Res* 2017;159:82–94. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2017.07.048>.
- [186] Hane F, Tran G, Attwood SJ, et al. Cu²⁺ Affects Amyloid- β (1–42) Aggregation by Increasing Peptide-Peptide Binding Forces. *PLoS One* 2013;8:e59005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0059005>.
- [187] Valiente-Gabioud AA, Torres-Monserrat V, Molina-Rubino L, et al. Structural basis behind the interaction of Zn²⁺ with the protein α -synuclein and the A β peptide: A comparative analysis. *J Inorg Biochem* 2012;117:334–41. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2012.06.011>.
- [188] Rose F, Hodak M, Bernholc J. Mechanism of copper(II)-induced misfolding of Parkinson's disease protein. *Sci Rep* 2011;1:11. <https://doi.org/10.1038/srep00011>.
- [189] Walke G, Kumar R, Wittung-Stafshede P. Copper ion incorporation in α -synuclein amyloids. *Protein Sci* 2024;33:e4956. <https://doi.org/10.1002/pro.4956>.
- [190] Lee M-C, Yu W-C, Shih Y-H, et al. Zinc ion rapidly induces toxic, off-pathway amyloid- β oligomers distinct from amyloid- β derived diffusible ligands in Alzheimer's disease. *Sci Rep* 2018;8:4772. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23122-x>.
- [191] Rana M, Sharma AK. Cu and Zn interactions with A β peptides: consequence of coordination on aggregation and formation of neurotoxic soluble A β oligomers. *Metallomics* 2019;11:64–84. <https://doi.org/10.1039/C8MT00203G>.
- [192] Ranjan P, Ghosh D, Yarramala DS, et al. Differential copper binding to alpha-synuclein and its disease-associated mutants affect the aggregation and amyloid formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 2017;1861:365–74. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.11.043>.
- [193] Żygowska J, Szymańska A. Rola metali w rozwoju choroby Alzheimer'a i Parkinsona. *Wiad Chem* 2022;76:1–25. <https://doi.org/10.53584/wiadchem.2022.1.1>.
- [194] Kaeser SA, Herzig MC, Coomaraswamy J, et al. Cystatin C modulates cerebral β -amyloidosis. *Nat Genet* 2007;39:1437–9. <https://doi.org/10.1038/ng.2007.23>.

- [195] Szymańska A, Marciniak A, Krzyżak E, et al. First studies on the interactions of the C-terminal cystatin C fragment 85–94 with Cu(II) ions. *J Coord Chem* 2019;72:1592–602. <https://doi.org/10.1080/00958972.2019.1605065>.
- [196] Marciniak A, Lewińska A, Wyrzykowski D, et al. Copper binding by the cystatin C fragment. The role of histidine residues. *Polyhedron* 2020;192:114824. <https://doi.org/10.1016/j.poly.2020.114824>.
- [197] Żygowska J, Orlikowska M, Zhukov I, et al. Copper interaction with cystatin C: effects on protein structure and oligomerization. *FEBS J* 2024;291:1974–91. <https://doi.org/10.1111/febs.17092>.
- [198] Bekard IB, Asimakis P, Bertolini J, et al. The effects of shear flow on protein structure and function. *Biopolymers* 2011;95:733–45. <https://doi.org/10.1002/bip.21646>.
- [199] Trumbore CN. Shear-Induced Amyloid Formation in the Brain: III. The Roles of Shear Energy and Seeding in a Proposed Shear Model. *J Alzheimers Dis* 2018;65:47–70. <https://doi.org/10.3233/JAD-171003>.
- [200] Foderà V, Pagliara S, Otto O, et al. Microfluidics Reveals a Flow-Induced Large-Scale Polymorphism of Protein Aggregates. *J Phys Chem Lett* 2012;3:2803–7. <https://doi.org/10.1021/jz301375d>.
- [201] Dunstan DE, Hamilton-Brown P, Asimakis P, et al. Shear-induced structure and mechanics of β -lactoglobulin amyloid fibrils. *Soft Matter* 2009;5:5020. <https://doi.org/10.1039/b914089a>.
- [202] Teoh CL, Bekard IB, Asimakis P, et al. Shear Flow Induced Changes in Apolipoprotein C-II Conformation and Amyloid Fibril Formation. *Biochemistry* 2011;50:4046–57. <https://doi.org/10.1021/bi2002482>.
- [203] Gospodarczyk W, Kozak M. The severe impact of in vivo-like microfluidic flow and the influence of gemini surfactants on amyloid aggregation of hen egg white lysozyme. *RSC Adv* 2017;7:10973–84. <https://doi.org/10.1039/C6RA26675D>.
- [204] Gospodarczyk W, Kozak M. Microchip Circulation Drastically Accelerates Amyloid Aggregation of 1–42 β -amyloid Peptide from *Felis catus*. *ACS Chem Neurosci* 2017;8:2558–67. <https://doi.org/10.1021/acscemneuro.7b00285>.
- [205] Lee JS, Ryu J, Park CB. High-Throughput Analysis of Alzheimer's β -Amyloid Aggregation Using a Microfluidic Self-Assembly of Monomers. *Anal Chem* 2009;81:2751–9. <https://doi.org/10.1021/ac802701z>.
- [206] Herling TW, Levin A, Saar KL, et al. Microfluidic approaches for probing amyloid assembly and behaviour. *Lab Chip* 2018;18:999–1016. <https://doi.org/10.1039/C7LC01241A>.
- [207] LeVine H. Quantification of β -sheet amyloid fibril structures with thioflavin T. *Methods Enzymol* 1999;309:274–84. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(99\)09020-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(99)09020-5).
- [208] Krebs MRH, Bromley EHC, Donald AM. The binding of thioflavin-T to amyloid fibrils: localisation and implications. *J Struct Biol* 2005;149:30–7. <https://doi.org/10.1016/j.jsb.2004.08.002>.
- [209] Lakowicz JR. *Principles of Fluorescence Spectroscopy*. Boston, MA: Springer US; 2006. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-46312-4>.

- [210] Rugar D, Hansma P. Atomic Force Microscopy. *Phys Today* 1990;43:23–30. <https://doi.org/10.1063/1.881238>.
- [211] Giessibl FJ. Advances in atomic force microscopy. *Rev Mod Phys* 2003;75:949–83. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.75.949>.
- [212] Tang CY, Yang Z. Transmission Electron Microscopy (TEM). Membrane Characterization, Elsevier 2017:145–59. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00008-5>.
- [213] Miles AJ, Wallace BA. Circular dichroism spectroscopy of membrane proteins. *Chem Soc Rev* 2016;45:4859–72. <https://doi.org/10.1039/C5CS00084J>.
- [214] Förster H. UV/VIS Spectroscopy. *Mol Sieves* 2004;4:337–426. <https://doi.org/10.1007/b94239>.
- [215] Kaszuba M, McKnight D, Connah MT, et al. Measuring sub nanometre sizes using dynamic light scattering. *J Nanopart Res* 2008;10:823–9. <https://doi.org/10.1007/s11051-007-9317-4>.
- [216] Mohamed MA, Jaafar J, Ismail AF, et al. Fourier Transform Infrared (FTIR) Spectroscopy. Membrane Characterization, Elsevier; 2017, p. 3–29. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63776-5.00001-2>.
- [217] Grdadolnik J. Saturation effects in FTIR spectroscopy: Intensity of amide I and amide II bands in protein spectra. *Acta Chim Slov* 2003;50:777–88.
- [218] Chittur KK. FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 1998;19:357–69. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(97\)00223-8](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(97)00223-8).
- [219] Ruggeri FS, Longo G, Faggiano S, et al. Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation. *Nat Commun* 2015;6:7831. <https://doi.org/10.1038/ncomms8831>.
- [220] Kikhney AG, Svergun DI. A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS Lett* 2015;589:2570–7. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2015.08.027>.
- [221] Jacques DA, Trehwella J. Small-angle scattering for structural biology—Expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci* 2010;19:642–57. <https://doi.org/10.1002/pro.351>.
- [222] Zimmermann P, Peredkov S, Abdala PM, et al. Modern X-ray spectroscopy: XAS and XES in the laboratory. *Coord Chem Rev* 2020;423:213466. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2020.213466>.
- [223] Bhatia SN, Ingber DE. Microfluidic organs-on-chips. *Nat Biotechnol* 2014;32:760–72. <https://doi.org/10.1038/nbt.2989>.
- [224] Huh D, Matthews BD, Mammoto A, et al. Reconstituting Organ-Level Lung Functions on a Chip. *Science* 2010;328:1662–8. <https://doi.org/10.1126/science.1188302>.
- [225] Katritsis D, Kaiktsis L, Chaniotis A, et al. Wall Shear Stress: Theoretical Considerations and Methods of Measurement. *Prog Cardiovasc Dis* 2007;49:307–29. <https://doi.org/10.1016/j.pcad.2006.11.001>.
- [226] Squires TM, Quake SR. Microfluidics: Fluid physics at the nanoliter scale. *Rev Mod Phys* 2005;77:977–1026. <https://doi.org/10.1103/RevModPhys.77.977>.

- [227] Kranz JK, Schalk-Hihi C. Protein Thermal Shifts to Identify Low Molecular Weight Fragments. *Methods Enzymol* 2011;493:277–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-381274-2.00011-X>.
- [228] Sari C. A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. *Haydarpasa Numune Med J* 2019. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2019.16443>.
- [229] Yu D, Zha Y, Zhong Z, et al. Improved detection of reactive oxygen species by DCFH-DA: New insight into self-amplification of fluorescence signal by light irradiation. *Sens Actuators B Chem* 2021;339:129878. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2021.129878>.
- [230] Ahamed M, Alhadlaq HA, Khan MAM, et al. Synthesis, Characterization, and Antimicrobial Activity of Copper Oxide Nanoparticles. *J Nanomater* 2014;2014. <https://doi.org/10.1155/2014/637858>.
- [231] Šulce A, Bulke F, Schowalter M, et al. Reactive oxygen species (ROS) formation ability and stability of small copper (Cu) nanoparticles (NPs). *RSC Adv* 2016;6:76980–8. <https://doi.org/10.1039/C6RA16599K>.
- [232] Caliebe WA, Murzin V, Kalinko A, et al. High-flux XAFS-beamline P64 at PETRA III. *AIP Conf Proc* 2019;2054:060031. <https://doi.org/10.1063/1.5084662>.
- [233] Kalinko A, Caliebe WA, Schoch R, et al. A von Hamos-type hard X-ray spectrometer at the PETRA III beamline P64. *J Synchrotron Radiat* 2020;27:31–6. <https://doi.org/10.1107/S1600577519013638>.
- [234] Blanchet CE, Spilotros A, Schwemmer F, et al. Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY). *J Appl Crystallogr* 2015;48:431–43. <https://doi.org/10.1107/S160057671500254X>.
- [235] Tully MD, Kieffer J, Brennich ME, et al. BioSAXS at European Synchrotron Radiation Facility – Extremely Brilliant Source: BM29 with an upgraded source, detector, robot, sample environment, data collection and analysis software. *J Synchrotron Radiat* 2023;30:258–66. <https://doi.org/10.1107/S1600577522011286>.
- [236] Manalastas-Cantos K, Konarev P V., Hajizadeh NR, et al. *ATSAS 3.0*: expanded functionality and new tools for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr* 2021;54:343–55. <https://doi.org/10.1107/S1600576720013412>.
- [237] Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* 2012;9:671–5. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>.
- [238] Nečas D, Klapetek P. Gwyddion: an open-source software for SPM data analysis. *Open Physics* 2012;10:181–8. <https://doi.org/10.2478/s11534-011-0096-2>.
- [239] Bin Mobarak M, Hossain MdS, Chowdhury F, et al. Synthesis and characterization of CuO nanoparticles utilizing waste fish scale and exploitation of XRD peak profile analysis for approximating the structural parameters. *Arab J Chem* 2022;15:104117. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2022.104117>.
- [240] Peng C, Shen C, Zheng S, et al. Transformation of CuO Nanoparticles in the Aquatic Environment: Influence of pH, Electrolytes and Natural Organic Matter. *Nanomaterials* 2017;7:326. <https://doi.org/10.3390/nano7100326>.

- [241] Andal V, Buvaneswari G. Effect of reducing agents in the conversion of Cu₂O nanocolloid to Cu nanocolloid. *Eng Sci Technol Int J* 2017;20:340–4. <https://doi.org/10.1016/j.jestch.2016.09.003>.
- [242] Beltrán-Partida E, Valdez-Salas B, Valdez-Salas E, et al. Synthesis, Characterization, and In Situ Antifungal and Cytotoxicity Evaluation of Ascorbic Acid-Capped Copper Nanoparticles. *J Nanomater* 2019;2019:1–10. <https://doi.org/10.1155/2019/5287632>.
- [243] Bhogale A, Patel N, Mariam J, et al. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;113:276–84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.021>.
- [244] Ramyadevi J, Jeyasubramanian K, Marikani A, et al. Synthesis and antimicrobial activity of copper nanoparticles. *Mater Lett* 2012;71:114–6. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2011.12.055>.
- [245] Rahimi P, Hashemipour H, Zadeh ME, et al. Experimental Investigation on the Synthesis and Size Control of Copper Nanoparticle via Chemical Reduction Method. *Int J Nanosci Nanotechnol* 2010;6:144–9.
- [246] Ahmad T. Ascorbic acid assisted synthesis, characterization and catalytic application of copper nanoparticles. *Mater Sci Eng Int J* 2018;2. <https://doi.org/10.15406/mseij.2018.02.00040>.
- [247] Xiong J, Wang Y, Xue Q, et al. Synthesis of highly stable dispersions of nanosized copper particles using l-ascorbic acid. *Green Chemistry* 2011;13:900. <https://doi.org/10.1039/c0gc00772b>.
- [248] Levine H. Thioflavine T interaction with synthetic Alzheimer's disease β -amyloid peptides: Detection of amyloid aggregation in solution. *Protein Sci* 1993;2:404–10. <https://doi.org/10.1002/pro.5560020312>.
- [249] Östner G, Lindström V, Hjort Christensen P, et al. Stabilization, Characterization, and Selective Removal of Cystatin C Amyloid Oligomers. *J Biol Chem* 2013;288:16438–50. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.469593>.
- [250] Rucińska K, Maksim J, Taube M, et al. Copper (II) oxide nanoparticles can induce amyloid aggregation of human cystatin C. *Chemical Communications (Wysłane)* 2025.
- [251] Chrabaszczewska M, Sieradzan AK, Rodziewicz-Motowidło S, et al. Structural Characterization of Covalently Stabilized Human Cystatin C Oligomers. *Int J Mol Sci* 2020;21:5860. <https://doi.org/10.3390/ijms21165860>.
- [252] Xicoy H, Wieringa B, Martens GJM. The SH-SY5Y cell line in Parkinson's disease research: a systematic review. *Mol Neurodegener* 2017;12:10. <https://doi.org/10.1186/s13024-017-0149-0>.
- [253] Agholme L, Lindström T, Kågedal K, et al. An In Vitro Model for Neuroscience: Differentiation of SH-SY5Y Cells into Cells with Morphological and Biochemical Characteristics of Mature Neurons. *J Alzheimers Dis* 2010;20:1069–82. <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-091363>.
- [254] Abrahamson M, Grubb A. Increased body temperature accelerates aggregation of the Leu-68-Gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in

- hereditarycystatin C amyloid angiopathy. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994;91:1416–20. <https://doi.org/10.1073/pnas.91.4.1416>.
- [255] Sawaya MR, Sambashivan S, Nelson R, et al. Atomic structures of amyloid cross- β spines reveal varied steric zippers. *Nature* 2007;447:453–7. <https://doi.org/10.1038/nature05695>.
- [256] Dregni AJ, Mandala VS, Wu H, et al. In vitro 0N4R tau fibrils contain a monomorphic β -sheet core enclosed by dynamically heterogeneous fuzzy coat segments. *Proc Natl Acad Sci USA* 2019;116:16357–66. <https://doi.org/10.1073/pnas.1906839116>.
- [257] Ruggeri FS, Longo G, Faggiano S, et al. Infrared nanospectroscopy characterization of oligomeric and fibrillar aggregates during amyloid formation. *Nat Commun* 2015;6:7831. <https://doi.org/10.1038/ncomms8831>.
- [258] Banerjee S, Holcombe B, Ringold S, et al. Nanoscale Infrared Spectroscopy Identifies Structural Heterogeneity in Individual Amyloid Fibrils and Prefibrillar Aggregates. *J Phys Chem B* 2022;126:5832–41. <https://doi.org/10.1021/acs.jpcc.2c04797>.
- [259] Sasanian N, Sharma R, Lubart Q, et al. Probing physical properties of single amyloid fibrils using nanofluidic channels. *Nanoscale* 2023;15:18737–44. <https://doi.org/10.1039/D3NR02740F>.
- [260] Mahmoudi M, Lynch I, Ejtehadi MR, et al. Protein–Nanoparticle Interactions: Opportunities and Challenges. *Chem Rev* 2011;111:5610–37. <https://doi.org/10.1021/cr100440g>.
- [261] Bhogale A, Patel N, Mariam J, et al. Comprehensive studies on the interaction of copper nanoparticles with bovine serum albumin using various spectroscopies. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;113:276–84. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2013.09.021>.
- [262] Rabbani G, Khan MJ, Ahmad A, et al. Effect of copper oxide nanoparticles on the conformation and activity of β -galactosidase. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2014;123:96–105. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.08.035>.
- [263] Koch MHJ, Vachette P, Svergun DI. Small-angle scattering: a view on the properties, structures and structural changes of biological macromolecules in solution. *Q Rev Biophys* 2003;36:147–227. <https://doi.org/10.1017/S0033583503003871>.
- [264] Guinier A, Fournet G. *Small-angle scattering of X-rays*. New York: John Wiley & Sons; 1955.
- [265] Salmina AB, Saridis MR, Ryzhkov V V., et al. Development of Microvascular Network in Microfluidic Brain-on-a-Chip Models In Vitro: A Multidisciplinary Review. *Biotechnol J* 2025;20:e70126. <https://doi.org/10.1002/biot.70126>.
- [266] Sorteberg W, Lindegaard K-F, Rootwelt K, et al. Blood velocity and regional blood flow in defined cerebral artery systems. *Acta Neurochir (Wien)* 1989;97:47–52. <https://doi.org/10.1007/BF01577739>.
- [267] Myers DR, Lam WA. Vascularized Microfluidics and Their Untapped Potential for Discovery in Diseases of the Microvasculature. *Annu Rev Biomed Eng* 2021;23:407–32. <https://doi.org/10.1146/annurev-bioeng-091520-025358>.

- [268] Ha J-H, Xu Y, Sekhon H, et al. Mimicking kidney flow shear efficiently induces aggregation of LECT2, a protein involved in renal amyloidosis. *J Biol Chem* 2024;300:107231. <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2024.107231>.
- [269] Sarı C. A comparative study of MTT and WST-1 assays in cytotoxicity analysis. *Haydarpasa Numune Med J* 2019. <https://doi.org/10.14744/hnhj.2019.16443>.
- [270] Awashra M, Młynarz P. The toxicity of nanoparticles and their interaction with cells: an *in vitro* metabolomic perspective. *Nanoscale Adv* 2023;5:2674–723. <https://doi.org/10.1039/D2NA00534D>.
- [271] Su Y, Chang P-T. Acidic pH promotes the formation of toxic fibrils from β -amyloid peptide. *Brain Res* 2001;893:287–91. [https://doi.org/10.1016/S0006-8993\(00\)03322-9](https://doi.org/10.1016/S0006-8993(00)03322-9).
- [272] Morris OM, Toprakcioglu Z, Röntgen A, et al. Aggregation of the Amyloid- β Peptide (A β 40) within Condensates Generated through Liquid-Liquid Phase Separation. *BioRxiv* 2023:2023.12.23.573169. <https://doi.org/10.1101/2023.12.23.573169>.
- [273] Lee JS, Park CB. Microfluidic dissociation and clearance of Alzheimer's β -amyloid aggregates. *Biomaterials* 2010;31:6789–95. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.05.033>.
- [274] Frey L, Ghosh D, Qureshi BM, et al. On the pH-dependence of α -synuclein amyloid polymorphism and the role of secondary nucleation in seed-based amyloid propagation. *Elife* 2024;12:RP93562. <https://doi.org/10.7554/eLife.93562>.
- [275] Vadukul DM, Papp M, Thrush RJ, et al. α -Synuclein Aggregation Is Triggered by Oligomeric Amyloid- β 42 via Heterogeneous Primary Nucleation. *J Am Chem Soc* 2023;145:18276–85. <https://doi.org/10.1021/jacs.3c03212>.
- [276] McCalpin SD, Khemtemourian L, Suladze S, et al. Zinc and pH modulate the ability of insulin to inhibit aggregation of islet amyloid polypeptide. *Commun Biol* 2024;7:776. <https://doi.org/10.1038/s42003-024-06388-y>.
- [277] Thorlaksen C, Stanciu A-M, Busch Neergaard M, et al. Morphological integrity of insulin amyloid-like aggregates depends on preparation methods and post-production treatments. *Eur J Pharm Biopharm* 2022;179:147–55. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2022.08.018>.
- [278] Willis LF, Brockwell DJ, Radford SE. In the flow, how fluid dynamics shapes amyloid formation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2025;122:e2504573122. <https://doi.org/10.1073/pnas.2504573122>.
- [279] Foderà V, Pagliara S, Otto O, et al. Microfluidics Reveals a Flow-Induced Large-Scale Polymorphism of Protein Aggregates. *J Phys Chem Lett* 2012;3:2803–7. <https://doi.org/10.1021/jz301375d>.
- [280] Radic S, Davis TP, Ke PC, et al. Contrasting effects of nanoparticle–protein attraction on amyloid aggregation. *RSC Adv* 2015;5:105489–98. <https://doi.org/10.1039/C5RA20182A>.
- [281] Cedervall T, Lynch I, Lindman S, et al. Understanding the nanoparticle–protein corona using methods to quantify exchange rates and affinities of proteins for nanoparticles. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:2050–5. <https://doi.org/10.1073/pnas.0608582104>.

- [282] Lundqvist M, Stigler J, Elia G, et al. Nanoparticle size and surface properties determine the protein corona with possible implications for biological impacts. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105:14265–70. <https://doi.org/10.1073/pnas.0805135105>.

Opis rozprawy doktorskiej:

Imię i nazwisko autora pracy	Karolina Rucińska
Adres e-mail, telefon autora pracy	karolinarucinska07@gmail.com 507862641
Imię i nazwisko promotora lub promotorów pracy	Prof. dr hab. Maciej Kozak – promotor dr Michał Taube – promotor pomocniczy
Wydział	Fizyki
Instytut/Zakład	Zakład Fizyki Biomedycznej
Tytuł pracy w jęz. polskim	Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C
Tytuł pracy w jęz. angielskim	The Influence of Microfluidic Flow and Metallic Nanoparticles on the Amyloidogenic Properties of Human Cystatin C
Język pracy	Polski
Słowa kluczowe w jęz. polskim (max 5)	nanocząstki tlenku miedzi(II), ludzka cystatyna C, amyloidogeneza, mikroprzepływ, oddziaływania nanocząstki-białko
Słowa kluczowe w jęz. angielskim (max 5)	copper(II) oxide nanoparticles, human cystatin C, amyloidogenesis, microfluidics, nanoparticle-protein interactions
Streszczenie pracy w jęz. polskim (max 1400 znaków)	<p>Celem pracy było zbadanie wpływu nanocząsteczek tlenku miedzi(II) (CuO NPs) na strukturę, stabilność i agregację ludzkiej cystatyny C (HCC) oraz określenie, czy powstające agregaty wykazują aktywność biologiczną. Nanocząstki CuO otrzymano syntetycznie i potwierdzono ich jednorodność, stabilność oraz dobre zdyspergowanie. Wykazano, że CuO NPs oraz jony Cu²⁺ obniżają stabilność natywnej HCC - zarówno formy monomerycznej, jak i dimerycznej. Agregacja HCC przebiegała odmiennie w zależności od pH i obecności nanocząsteczek CuO. W pH 6 białko nie tworzyło agregatów, lecz dodatek CuO NPs inicjował powstawanie struktur fibrylarnych. W pH 4 białko agregowało spontanicznie, a nanocząstki modulowały morfologię agregatów - od form pierścieniowych po</p>

	<p>grube struktury fibrylarne. Komplementarne techniki potwierdziły wzrost udziału struktur β, zmiany konformacyjne oraz powstawanie większych, bardziej wydłużonych agregatów. W warunkach mikroprzepływu proces był szybszy i bardziej heterogeniczny.</p> <p>Badania na komórkach SH-SY5Y wykazały, że formy powstałe po inkubacji HCC z CuO NPs znacznie obniżają żywotność komórek oraz zwiększają poziom reaktywnych form tlenu. Wyniki pokazują, że nanocząsteczki CuO wpływają na przebieg przemian HCC - od destabilizacji struktury natywnej, poprzez inicjację wczesnych etapów agregacji, aż po formowanie biologicznie aktywnych agregatów.</p>
Streszczenie pracy w jęz. angielskim (max 1400 znaków)	<p>The aim of this study was to investigate how copper(II) oxide nanoparticles (CuO NPs) affect the structure, stability, and aggregation of human cystatin C (HCC), and whether the resulting aggregates exhibit biological activity. CuO NPs were synthetically obtained and confirmed to be stable and well-dispersed. Both CuO NPs and Cu²⁺ ions reduced the stability of native HCC in its monomeric and dimeric forms.</p> <p>HCC aggregation depended on pH and the presence of nanoparticles. At pH 6, HCC did not aggregate on its own, whereas CuO NPs initiated fibril formation. At pH 4, HCC aggregated spontaneously, and the nanoparticles modulated aggregate morphology - from ring-like structures to thick fibrils. Complementary techniques confirmed increased β-sheet content, conformational changes, and the formation of larger, more elongated aggregates. Under microfluidic conditions, aggregation proceeded faster and was more heterogeneous.</p> <p>SH-SY5Y cell assays showed that structures formed after incubation of HCC with CuO NPs decreased cell viability and elevated reactive oxygen species levels. Overall, the results indicate that CuO nanoparticles influence the transformation pathway of HCC - from destabilization of its native structure through early aggregation steps to the formation of biologically active aggregates.</p>
liczba stron	178

The Influence of Microfluidic Flow and Metallic Nanoparticles on the Amyloidogenic Properties of Human Cystatin C

mgr Karolina Rucińska

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the influence of copper(II) oxide (CuO) nanoparticles on the structure, conformational stability, and aggregation process of human cystatin C (HCC), as well as to determine whether the resulting HCC aggregates exhibit biological activity on their own. The experiments were carried out in two systems - under incubation conditions and in microfluidic flow - which allowed for comparison of the aggregation process in an environment mimicking physiological fluid flow.

CuO nanoparticles were synthetically obtained and characterized in terms of structure, chemical composition, and morphology. They were shown to be monodisperse, stable, and well-dispersed, which enabled their use in subsequent analyses.

In the first stage, the effects of CuO nanoparticles and Cu²⁺ ions on the stability of HCC were evaluated. Fluorescence measurements with SYPRO Orange revealed a decrease in the melting temperature of both the monomeric and dimeric forms of HCC, indicating reduced stability of the native cystatin structure.

Next, the aggregation behavior of HCC was analyzed under different conditions. At pH 6, the protein alone did not form aggregates; however, in the presence of CuO nanoparticles, a detectable ThT signal appeared along with the first fibrillar structures observed by AFM, indicating initiation of aggregation at the nanoparticle surface. At pH 4, HCC aggregated spontaneously, and the presence of CuO modified the morphology of the resulting structures in a concentration-dependent manner, ranging from ring-like forms to thick fibrillar structures.

ATR-FTIR and nanoIR spectroscopy confirmed an increased contribution of β -sheet structures in the HCC aggregates (approx. 44–46%) and a reduction in α -helical content. SAXS analysis revealed an increase in the size of the formed structures and a shift toward more elongated conformations. Under microfluidic conditions, aggregation proceeded more rapidly but exhibited greater heterogeneity - nanoIR revealed local differences in β -sheet content, indicating the coexistence of aggregates at different maturation stages within the same sample.

Finally, biological assays using SH-SY5Y neuroblastoma cells were performed to assess the potential effects of HCC aggregates and CuO nanoparticles on cell viability. Reference nanoparticle and protein samples at the tested concentrations were not cytotoxic, whereas their combination led to decreased cell viability and increased levels of reactive oxygen species (ROS). These results indicate that HCC aggregates formed in the presence of CuO nanoparticles can induce oxidative stress and exhibit cytotoxic effects.

Overall, the results demonstrate that CuO nanoparticles influence all stages of human cystatin C transformation - from destabilization of its native structure, through acting as nucleation sites that promote local protein accumulation and conformational rearrangements, to the formation of aggregates with diverse morphology and biological activity. This work provides a coherent description of the influence of CuO nanoparticles on human cystatin C under both shaking incubation and microfluidic flow conditions.