

STRESZCZENIE
rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Rucińskiej
pt: Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C

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.