

Prof. dr hab. Józef Garbarczyk  
Emerytowany profesor Politechniki Poznańskiej

Recenzja pracy doktorskiej Pani mgr Karoliny Rucińskiej  
z Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza  
pt **Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na  
właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C**

Praca doktorska Pani mgr Karoliny Rucińskiej poświęcona jest analizie zmian w strukturze ludzkiej cystatyny C (HCC) poddanej działaniom fizykochemicznym zwłaszcza domieszkowaniem tlenkiem miedzi.

Tematyka rozprawy jest kolejnym bardzo interesującym zagadnieniem realizowanym w Zakładzie Fizyki Biomedycznej pod kierunkiem profesora Macieja Kozaka.

Treść rozprawy przedstawiona jest w dziewięciu rozdziałach. Układ pracy jest tradycyjny, czyli zawiera wprowadzenie, opis stosowanych metod badawczych, część doświadczalną z opisem przeprowadzonych eksperymentów, następnie prezentowane są uzyskane wyniki, dyskusja wyników, wnioski i obszerna bibliografia, która obejmuje 282 pozycje.

W dwu pierwszych rozdziałach określono cel pracy oraz uzasadnienie podjęcia badań. Elementami poprzedzającymi te rozdziały są streszczenia w języku polskim i angielskim.

Celem szczegółowym było poszukiwanie odpowiedzi na pytanie, czy oraz w jaki sposób nanocząstki tlenku miedzi (II) (CuO) oraz przepływ mikrofluidyczny wpływają na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C (HCC).

Poznanie wpływu tlenku miedzi na zmiany w organizmach skutkujące agregacją cystatyny jest również związane z ekologią. Autorka to bardzo dobrze uzasadnia, pokazując (w rozdziale 3.2) jakie cząstki tego pierwiastka, a zwłaszcza w rozmiarach nanometrycznych znajdują się w powietrzu. Pobieżna analiza literatury naukowej wskazuje na rosnące zainteresowanie tym związkiem. Jest to związane z jego atrakcyjnymi właściwościami elektrycznymi i optycznymi a tym samym zastosowaniem w technice, zwłaszcza w fotowoltaice. Według bazy sciencedirect.com tylko w 2022

roku zanotowano ponad 5000 prac związanych z nano CuO. Rosnące zainteresowanie odnawialnymi źródłami energii elektrycznej wskazują, że należy się spodziewać zwiększającej się zawartości takich nanocząstek w powietrzu, a tym samym większe zagrożenie dla zdrowia.

Autorka (rozdział 3.3 wprowadza) czytelnika w zagadnienia szkodliwości nano CuO, w odniesieniu do chorób neurodegeneracyjnych, związanych z oddziaływaniem z ludzką cystatyną.

Treść zawarta w tym rozdziale pokazuje, że doktorantka dobrze przygotowała się do realizacji postawionych sobie zadań. Obszerne opisy wraz rysunkami w sposób bardzo jasny przedstawiają złożoność problemów, które będą omawiane w rozprawie.

Zagadnienia rozszyfrowywania problemów biologicznych na poziomie molekularnym są niezwykle ważne, ale i bardzo trudne. Badania takie wymagają od badacza wiedzy zarówno z zakresu biologii białek będących przyczyną chorób a także metod instrumentalnych pozwalających badać takie złożone układy

Analizując rozprawę mogę stwierdzić, że doktorantka z tego zadania wywiązała się bardzo dobrze, co pokazuje między innymi treść rozdziału 4, w którym autorka opisuje 14 właściwie dobranych metod badawczych.

Sposoby otrzymywania materiałów a więc cystatyny, CuO i miedzi w rozmiarach nano metrycznych oraz szczegóły stosowanych metod badawczych przedstawione są w rozdziale 5. Preparatyka poszczególnych materiałów została opisana bardzo szczegółowo co w połączeniu z instrumentalną analizą identyfikacyjną świadczy o rzetelności przedstawianych wyników.

Nadprodukcja cystatyny C, została przeprowadzona w szczepie *E. coli* SHuffle® T7 według metody opisanej w publikacji, której doktorantka jest współautorką. Białko zostało starannie oczyszczone metodą chromatografii żelowej i weryfikowane metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (SDS PAGE) a następnie liofilizowane.

Poza monomerem wyodrębniono również wyraźnie oddzieloną frakcję o większej masie cząsteczkowej, odpowiadającą formie dimerowej HCC.

Preparatyka nanocząstek tlenku miedzi była oparta o metodę opisaną w pracy Ahameda i współpracowników, natomiast syntezę nanocząstek metalicznej miedzi przeprowadzono według metody opisanej przez Sulce i współpracowników.

Tutaj pragnę podkreślić, że autorka stosowała bardzo wyrafinowane metody badawcze jak np. nanospektroskopia w podczerwieni inaczej połączenie mikroskopii sił atomowych z spektroskopią w podczerwieni AFM-IR (NanoIR)

Wśród prezentowanych metod na szczególne podkreślenie zasługuje analiza efektów mikro przepływowych. Badania te miały na celu sprawdzenie jak czynniki mechaniczne czyli przepływy i naprężenie ścinające wpływają na aranżację przestrzenną cystatyny C. Na potrzeby tych eksperymentów doktorantka opracowała specjalny system mikrofluidyczny. Te doświadczenia stanowiły symulację takich przepływów *in vivo*

W kolejnym rozdziale przedstawiono wyniki oceny jakościowej nano CuO. Autorka stosując właściwie dobrane metody, a więc Uv-Vis, WAXS, transmisyjną mikroskopię elektronową (TEM) oraz spektroskopie absorpcji promieniowania rentgenowskiej (XAS) bez wątpliwości wykazała, że otrzymane nanocząstki tlenku miedzi mają średnią wielkość na poziomie 5,48nm .

Natomiast nanocząstki miedzi analizowano metodami UV-Vis, AFM dynamicznego rozpraszania światła (DSL) oraz (XAS). W oparciu o wyniki tych badań doktorantka wykazała, że pomimo tego, iż cząstki Cu mają odpowiednie rozmiary nie nadają się do dalszych badań, z powodu trudności z określeniem stężenia w fazie wodnej.

Dla porównania badane były również komercyjne nanocząstki miedzi, tlenku miedzi oraz cynku i tlenku cynku. Przeprowadzona analiza wykazała, że preparaty charakteryzowały się przede wszystkim dużą niejednorodnością wymiarową co wyeliminowało ich przydatność w dalszych badaniach

Wyniki badań które były głównym celem pracy, a mianowicie charakterystyka układów cystatyny C z nano CuO opisano w podrozdziale 6,4. Autorka stwierdziła, że obecność nano CuO powoduje obniżenie temperatury topnienia cystatyny C. Dla rozstrzygnięcia, czy obniżenie temperatur topnienia są efektem fizycznego oddziaływania z powierzchnią nano CuO, czy też jonów  $\text{Cu}^{+2}$  przeprowadzono eksperyment z  $\text{CuCl}_2$ , który wykazał, że w tym drugim przypadku temperatura topnienia obniżyła się o kilka stopni.

Dla porównania przedstawiono również badania właściwości termiczne dimeru cystatyny C.

Skutki obecności nano CuO na agregacje cystatyny C przedstawiono w kolejnym podrozdziale. Eksperymenty przeprowadzono w dwu warunkach

kwasowości, przy pH 6 i pH i temperaturze 47°C. Autorka wykazała, że w pierwszym przypadku nano cząstki CuO indukują proces agregacji, natomiast przy pH 4 obecność cząstek CuO przyczynia się do spowolnienia tworzenia struktur amyloidowych, w porównaniu do HCC bez dodatku.

Pragnę zaakcentować obrazowanie metodą AFM, dzięki którym doktorantka udowodniła zróżnicowanie struktur tworzących się agregatów, szczególnie w obecności nano CuO

Interesująca obserwacją było również to, że obecność nano CuO ma wpływ na cytoksycywność i jest to głównie związane z tzw. stresem oksydacyjnym.

Istotną częścią doktoratu jest analiza efektów przepływowych na agregację cystatyny C w obecności nano cząstek CuO. Należy tutaj podkreślić ważność tego typu badań, gdyż jak wiadomo przepływy w naczyniach krwionośnych człowieka są kluczowe dla podtrzymania życia, zapewniając transport niezbędnych składników,

Jak już wspominałem powyżej, autorka dla tego cyklu badań skonstruowała specjalny układ. Zastosowanie specyficznego zaworu o nazwie MUX 6/2 umożliwiło wielokrotne powtarzania przepływu cieczy. W układzie tym sprawdzano, czy przepływ modyfikują agregację białka zwłaszcza w obecności nano CuO

Efekty eksperymentu analizowano w temperaturze 47°C i pH 6 i 4 oraz zmiennym czasie cyrkulacji

Metodą mikroskopii sił atomowych udowodniono bez wątpliwości, że przepływy mają istotne znaczenie w tworzeniu struktur włóknistych, chociaż przy pH 4 efekty te są zdecydowanie wyraźniejsze. Na uwagę zasługuje również analiza statystyczna obserwowanych zjawisk.

Obserwacje zanotowane metodami AFM doktorantka potwierdziła wynikami pomiarów małokątowej dyfrakcji rentgenowskiej SAXS. Interesująca jest analiza metodami nanoIR a także ATR-FTIR, dzięki którym autorka wykazała zmiany w strukturze drugorzędowej cystatyny C.

Krytyczna analiza uzyskanych rezultatów w konfrontacji z danymi literaturowymi doktorantka przedstawiła w obszernym rozdziale zatytułowanym *Dyskusja wyników*.

W podsumowaniu zaproponowała interesujący ogólny mechanizm agregacji HCC w obecności nanocząstek CuO, obejmujący zarówno zmienne pH jak i mikroprzepływy.

Wnioski z badań zebrane w rozdziale 8, nie budzą żadnych zastrzeżeń.

## Pytania i uwagi redakcyjne

1. Dlaczego badano układy w przy PH 4, czy ma to jakieś uzasadnienie fizjologiczne?

Z drugiej strony wiadomym jest, że w warunkach kwasowych CuO reaguje z protonem i powstają jony  $\text{Cu}^{+2}$ , czy zatem analizowano obecność tlenku i jonów?

2. Autorka w kilku miejscach efekty oddziaływania cystatyny tłumaczy adsorpcją na powierzchni nano CuO, czy analizowano powierzchnię właściwą tlenku

*Cytat „Drugim istotnym czynnikiem wpływającym na przebieg agregacji jest oddziaływanie cystatyny C z powierzchnią nanocząstek CuO”. Str 145*

3. Na stronach 67 i 67 jest informacja „...przeniesiono do fazy organiczne’ co stanowiło fazę organiczną?

## Uwagi redakcyjne

Czytając pracę zauważyłem kilka tzw. lapsusów. Przytoczę dwa :

-Str 146 „ analiza lokalna” co to znaczy (?)

-Pod rysunkami 66 i 67 jest zdanie: *Na wykresie poziomy istotności oznaczono gwiazdkami: \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001.* Tymczasem poza jedną gwiazdką na wykresach nie widać innych oznaczeń .

## PODSUMOWANIE

Lektura rozprawy pozwala na stwierdzenie, że prezentowane rezultaty zawierają wiele nowych informacji, poszerzających a także pogłębiających wiedzę o właściwościach ludzkiej cystatyny C, objaśniają znaczenia tlenku i jonów miedzi w procesach agregacji cząsteczek tego białka. Informacje zawarte w rozprawie stanowią istotny krok w poznaniu zachowania cystatyny C w różnych warunkach fizykochemicznych, objaśniają rolę nanocząstek metali w procesie przebudowy struktury białka oraz konsekwencje biologiczne potwierdzone odpowiednimi testami.

Prezentowane wyniki będą pomocne w dalszych badaniach nad znaczeniem zanieczyszczeń środowiskowych prowadzących do rozwoju chorób neurodegeneracyjnych.

Wykonane eksperymenty wraz z omówieniem rezultatów, pozwalają wyrazić opinię, że mgr Karolina Rucińska potrafi kompetentnie posługiwać się wieloma metodami badawczymi, a uzyskane wyniki właściwie i krytycznie interpretować

### **WNIOSEK KOŃCOWY**

Biorąc pod uwagę całość rozprawy, z całym przekonaniem wyrażam opinię, że przedstawione wyniki mają dużą wartość poznawczą ale też praktyczną, między innymi wskazującą jak zanieczyszczenia powietrza mogą wpłynąć na wywoływanie chorób typu Alzheimerera czy Parkinsona. Praca zawiera wiele nowych oryginalnych obserwacji pozwalających lepiej zrozumieć zmiany występujące w procesach chorobowych człowieka

Bez wątpliwości stwierdzam, że recenzowana rozprawa spełnia warunki przewidziane stosowną ustawą dla prac doktorskich i dlatego wnoszę do Wydziału Fizyki i Astronomii UAM o dopuszczenie magister Karolinę Rucińską do kolejnych etapów postępowania kwalifikacyjnego oraz do publicznej dyskusji na temat rozprawy..

15.04.2026

