



Poznań 31.03.2026

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Karoliny RUCIŃSKIEJ

**pt. „Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek
metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C”**

*praca realizowana na Wydziale Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama
Mickiewicza w Poznaniu.*

Promotor: prof. dr hab. Maciej KOZAK

Promotor pomocniczy: dr Michał TAUBE

Podstawa formalna wykonania recenzji

Podstawą formalną przygotowania recenzji jest pismo Pana prof. dr hab. Ireneusza Weymanna z dnia 9.02.2026 roku (BOW/040/02.2026/KP), w którym zwraca się z prośbą o recenzję pracy doktorskiej mgr Karoliny Rucińskiej.

Dokumenty: Rozprawa Doktorska P. mgr Karoliny Rucińskiej, opinie o pracy promotora i promotora pomocniczego oraz oświadczenie o wykładzie do publikacji.

1. Wprowadzenie do tematu

Problemy z koncentracją, utrata pamięci, dezorientacja, a także zaburzenie równowagi, drżenie czy spowolnienie ruchów, osłabienie mięśni, zmiana zachowania, depresja mogą być objawami chorób neurodegeneracyjnych (ND). Do najczęściej wymienianych i najczęściej występujących w społeczeństwie chorób ND zaliczyć można choroby: Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona stwardnienie zanikowe boczne, otępienie czołowo-skroniowe oraz ataksje rdzeniowo-mózdkowe. Wśród mechanizmów i



czynników stojących u podstaw zachorowań wyróżnić można: patologie białkowe, dysfunkcje mitochondriów, stres oksydacyjny oraz stany zapalne mózgu o różnej etiologii. Wśród czynników ryzyka wyodrębnić można wiek, podłoże genetyczne, wpływ środowiska, urazy głowy oraz styl życia (w tym brak work-life-balance). Coraz częściej jest również badany wpływ struktury w rozmiarze nanometrycznym na ND.

Jednym z białek wpływających na rozwój i przebieg ND jest ludzka cystatyna C, która może pełnić dwojaką rolę: neuroprotekcijną (hamowanie agregacji białek) oraz patologiczną (gdy sama ulega agregacji).

Autorka rozprawy doktorskiej podjęła się pionierskich badań w określeniu wpływu przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C.

Dobór tematyki rozprawy doktorskiej uważam za bardzo ważny w kontekście badań multidyscyplinarnych obejmujących szeroko pojętą fizykę (biofizykę), chemię, nanotechnologię medycynę, a przyszłościowo również farmację. Wskazać należy, że problem chorób neurodegeneracyjnych jest narastający i poszukiwanie podstaw mechanizmów chorobotwórczych jest niezbędnym krokiem milowym do opracowania skutecznych terapii i leków.

2. Ocena formalna Rozprawy Doktorskiej

P. mgr Karolina Rucińska jest autorką rozprawy doktorskiej w postaci monografii. Dzieło składa się z 178 stron i zostało podzielone na 9 głównych rozdziałów:

- 1) Cel pracy
- 2) Motywacja do podjęcia problemu badawczego
- 3) Wprowadzenie
- 4) Metody badawcze
- 5) Część doświadczalna – materiał i metody
- 6) Wyniki
- 7) Dyskusja wyników



8) Wnioski

9) Bibliografia

Na samym początku pracy (rozdział 1, str. 9) Autorka sformułowała hipotezę badawczą „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”.

Za cele etapowe do zweryfikowani hipotezy badawczej obrała:

- 1) Uzyskanie nanocząstek CuO do badań
- 2) Określenie właściwości fizykochemicznych nanocząstek CuO
- 3) Uzyskanie rekombinowanej ludzkiej cystatyny C
- 4) Zbadania wpływu nanocząstek CuO na stabilność i agregację HCC
- 5) Opracowanie systemu mikroprzepływowego do badań agregacji HCC
- 6) Określenie cytotoksyczności powstających agregatów HCC.

Hipoteza i cele badawcze odpowiadają aktualnym problemom naukowym związanym m.in. z wpływem zróżnicowanych mechanizmów pomiędzy zmianami strukturalnymi białka a chorobami neurodegeneracyjnymi oraz określenie wpływu wybranych nanostruktur. Szczególnie istotnym aspektem jest wytypowanie struktur miedzi o rozmiarach submikronowych do badań. Cząstki, w tym nanocząstki miedzi, tlenku miedzi oraz cynku czy tlenku cynku są często uznawane za bezpieczne i badane w kontekście ich właściwości przeciwbakteryjnym i przeciwdrobnoustrojowym.

Stwierdzono, że układ pracy jest przejrzysty i w łatwy sposób można nadążyć za przyjętym tokiem badawczym. Przyjęta metodologia i metodyka badawcza są prawidłowe w kontekście sformułowanego celu badawczego oraz uzasadnione z naukowego punktu widzenia. Stwierdzono, że treść pracy odpowiada zdefiniowanemu celowi i ma wysoką wartość naukową i wnosi istotny wkład w rozwój nauk fizycznych. Zapisy w pracy



doktorskiej uprawdopodobniają, że hipoteza i cele badawcze zostały zweryfikowane, a treść pracy odpowiada jej tematowi.

3. Ocena merytoryczna Rozprawy Doktorskiej

Rozprawa doktorska, autorstwa P. mgr Karoliny Rucińskiej układa się w logiczną całość. We wprowadzeniu przedstawiła m.in. jak istotny jest problem chorób neurodegeneracyjnych i ich możliwą etiologię (w tym czynniki na poziomie molekularnym – Rysunek 1, Rysunek 3). Następnie w rozdziale 3.2 opisała pochodzenie nanocząstek w środowisku, zwracając uwagę na zanieczyszczenia środowiskowe i pył zawieszony PM2.5. Autorka zwraca uwagę na pochodzenie analizowanych przez siebie cząstek miedzi, cynku i żelaza oraz ich tlenków. W tej części skupia się głównie na negatywnym oddziaływaniu.

Rozdział 3.3 poświęcony jest ludzkiej cystatynie C i jej wpływowi nie tylko na ND, ale także na inne schorzenia. Na szczególną uwagę zasługuje opis diagnostycznej roli cystatyny C. Jest to kolejny argument przemawiający za koniecznością prowadzenia badań w temacie rozprawy doktorskiej.

Rozdział 3.4 poświęcono roli miedzi i cynku w ND, a rozdział 3.5 uwypukła, dlaczego istotne jest podjęcie badań w układzie naczyniowym.

W rozdziale 4 opisano metody badawcze. Jest to jedno z ciekawszych opracowań, które mogłoby pełnić rolę osobnej monografii i być bardzo dobrze opracowanym materiałem dydaktycznym. Tu chcę wyróżnić bardzo interesująco i przyjaznym językiem opisany proces detekcji amyloidogeny. Następnie opisano wykorzystane metody badawcze: mikroskopię AFM, transmisyjną mikroskopię elektronową, spektroskopię dichroizmu kołowego, UV-Vis, DLS (dynamiczne rozpraszanie światła), FTIR, SAXS, XAS, XRD, przepływ mikrofluidyczny, analizę termicznej stabilności białek metodą termofluorometryczną, testy przeżywalności komórek oraz oznaczanie reaktywnych form tlenu.

Rozdział 5 to opis części doświadczalnej poświęcony materiałom i metodom. Zaczyna się od opisu wytwarzania cystatyny C oraz wybranych nanocząstek oraz ich podstawową charakterystykę. Rysunek 11 przedstawiający układ mikrofluidyczny jest bardzo istotny z



punktu widzenia weryfikacji jego geometrii i możliwości odtworzenia eksperymentu w przyszłości. Opis metod jest klarowny i umożliwia powtórzenie badań. Metody i narzędzia właściwie dobrano w kontekście zaplanowanych celów i tematu pracy.

W rozdziale 6 opisano uzyskane wyniki. W sekcji 6.1. opisano charakterystykę wybranych nanocząstek – syntetyzowanych przez Doktorantkę, jak i komercyjnie dostępnych. Tu uwagę zwraca Rysunek 15, gdzie przedstawiono widmo UV-Vis tlenku cynku, w mojej ocenie nie jest to metoda, która by w pełni odzwierciedlała czystość uzyskanego produktu. Natomiast na Rysunku 16 w profesjonalny sposób pokazano widmo XRD, badanych próbek – tu uwagę zwraca dodanie krzywej różnicowej, pomiędzy danymi eksperymentalnymi a obliczeniowymi. Zdjęcia TEM potwierdzają zakładany rozmiar nanocząstek, poniżej 20nm. Z kolei na Rysunku 23 nie można wyraźnie zdefiniować rozmiaru zsyntetyzowanych cząstek miedzi. Tematem do dyskusji są przeprowadzone badania DLS i ich interpretacja.

O zaciekłości naukowej, niezwykle istotnej z punktu widzenia rozwoju naukowego, świadczy rozdział 6.1.3. w którym Autorka opisuje poszukiwanie alternatywnych rozwiązań dla zsyntetyzowanych przez siebie nanocząstek. W celu znalezienia alternatywnych rozwiązań, które mogłyby być zastosowane w dalszej części badań, przeprowadziła analizy cząstek komercyjnych, w tym Cu, CuO, Zn, ZnO. Jednakże prezentacja uzyskanych wyników, w tym wypadku mogłaby być bardziej klarowna – nie do końca wiadomo, które wyniki dotyczą, których próbek (prawdopodobnie chodziło o zachowanie tej samej kolejności jak w tabeli 2), jednak w tym przypadku za bardziej właściwe należało przyjąć oznaczenie kodowe próbek. Zdjęcia TEM wskazały, że morfologia cząstek komercyjnych jest bardzo zróżnicowana.

Z naukowego punktu widzenia, za szczególnie ważny uważam rozdział 6.2, w którym Autorka przedstawia analizę przydatności badanych nanostruktur do dalszych badań. Tu uwidacznia się umiejętność krytycznej analizy uzyskanych wyników badawczych Doktorantki.

Rozdział 6.3 poświęcono szczegółowej analizie wytworzonej cystatynie C, a 6.4 układowi HCC z wybranymi cząstkami tlenku miedzi. Tu, za szczególnie istotne uważam wyniki związane z uprawdopodobnieniem wpływu wybranych cząstek na HCC, oraz mechanizm agregacji amyloidowej. W tych badaniach uwidacznia się zaleta mikroskopii



AFM, w analizie oddziaływań białko-cząstka. Obrazy AFM bardzo dobrze odzwierciedlają strukturę powstałych układów, w tym tworzenie się struktury włosowatej. Przykładowo na Rysunku 63 przedstawiono profil fazowy próbek oraz obraz w przekroju. Następnie opisano wyniki testów przeżywalności wybranych linii komórkowych.

Rozdział 6.4.4. poświęcono opisowi wpływu warunków mikroprzepływu w proces agregacji HCC. Tu również bardzo przydatną metodą analityczną okazało się obrazowanie AFM. Autorka przedstawiła zmiany strukturalne również w różnych warunkach pH. Rysunek 90 ponownie uprawdopodobnia umiejętności krytycznej analizy wyników przez Doktorantkę, która formułuje wniosek odnośnie możliwości wykorzystania metody CD w dalszych analizach.

Wskazać należy, że Doktorantka przeprowadziła prace eksperymentalne przy użyciu unikatowej aparatury badawczej, takiej jak SAXS, w celu określenia struktury białka. Tu na uwagę zasługują badania nad zmianami wywołanymi poprzez przepływ mikrofluidyczny. Za unikatowe i nowatorskie uważam również wyniki analizy Guiniera dla badanych układów HCC – NPs (Rysunek 97) – potwierdzenie hipotezy o wpływie NPs na zwiększenie agregacji białka.

Uwypuklić również należy zastosowanie w analizach aparatury nanoIR, gdzie jednocześnie zbierany jest sygnał IR i następuje analiza AFM – mapowanie występowania wybranych związków chemicznych.

W rozdziale 7 Autorka przeprowadziła dyskusję uzyskanych wyników w kontekście literatury przedmiotu. Doktorantka przedstawia systematycznie uzyskiwane najważniejsze wyniki, a następnie na tej podstawie proponuje mechanizm agregacji HCC modulowanej przez nanocząstki CuO (Rysunek 103 i 104). Natomiast na str. 151 przedstawiono fazy procesu: 1) destabilizacji struktury natywnej, 2) nukleacja na powierzchni nanocząstki, 3) wzrost i organizacja agregatów (tu zaproponowano 3 mechanizmy).

W rozdziale 8 Doktorantka sformułowała 8 wniosków końcowych, stanowiących podsumowanie przeprowadzonych badań. Autorka uwypukliła wyniki związane z:

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



- ii. Obecność nanocząstek CuO oraz jonów miedzi prowadziła do obniżenia stabilności struktury natywnej HCC jeszcze przed rozpoczęciem agregacji
- iii. Nanocząstki CuO inicjowały agregację HCC już w pH6, czyli warunkach, w których samo białko pozostaje w formie natywnej
- iv. W pH4 HCC agregowało spontanicznie, jednak obecność CuO modyfikowała przebieg oraz morfologię powstających struktur
- v. W warunkach mikroprzepływu agregacja HCC zachodziła szybciej i prowadziła do większego zróżnicowania strukturalnego niż w warunkach inkubacji z wytrząsaniem
- vi. Analizy SAXS, AFM, ATR-FTIR i nanoIR potwierdziły utratę struktury natywnej HCC i przejście uporządkowanych form bogatych w elementy beta.
- vii. Powstające agregaty HCC-CuO wykazywały działania cytotoksyczne oraz indukowały stres oksydacyjny w komórkach
- viii. Mechanizm oddziaływania HCC z CuO obejmuje kolejno destabilizację struktury białka, absorpcję na powierzchni nanocząstki, tworzenie miejsc nukleacji, wzrost struktur beta i powstawanie agregatów o znaczeniu biologicznym.

Podsumowując, opis przedstawiony w rozprawie doktorskiej uprawdopodobnia weryfikację przyjętej hipotezy badawczej oraz realizację celów szczegółowych pracy. Metody i metodologia zostały właściwie dobrane, a jak wspomniano uprzednio, na szczególną uwagę zasługuje wykorzystanie unikalnych metod analitycznych oraz przeprowadzenie badań w renomowanych ośrodkach badań synchrotronowych, m.in. w Krakowie i DESY w Hamburgu,

Tu zaznaczyć należy, że zarówno hipoteza, jak i zdefiniowane cele badawcze idealnie wpisują się w najnowsze trendy badań nad mechanizmami powstawania chorób neurodegeneracyjnych. Rozprawa doktorska p. mgr Karoliny Rucińskiej, wskazuje, że Doktorantka nabyła umiejętność interpretacji wyników, w tym w odniesieniu do literatury przedmiotu. Oceniono, że w rozprawie doktorskiej właściwie dobrano odnośniki literaturowe do przedstawionych wyników badań.



4. Ocena poprawności redakcyjnej rozprawy

Rozprawa doktorska p. mgr Karoliny Rucińskiej ma klarowną strukturę, umożliwiającą znalezienie wybranych informacji. Autorka, jak już wspomniano, podzieliła pracę na 9 rozdziałów, składających się z podrozdziałów.

Na podstawie analizy tekstu stwierdzono, że proporcje pomiędzy poszczególnymi rozdziałami są adekwatne – wprowadzenie (rozdział 3) oraz metody badawcze (rozdział 4) są proporcjonalne do części doświadczalnej, wyników i dyskusji wyników (rozdziały 5–7).

Praca cechuje się dużą starannością edytorską (występują bardzo nieliczne literówki), rysunki, grafiki są czytelne i właściwie opisane.

W przyszłych pracach rekomenduje się wprowadzenie numeracji równań oraz utworzenie wykazu użytych skrótów (ułatwia to znacznie odbiór prac naukowych).

Bibliografia jest wykonana starannie i przedstawia aktualny stan wiedzy w temacie rozprawy doktorskiej oraz właściwie odnosi się do przedmiotu dyskusji wyników. Autorka cytuje 282 pozycje literaturowe bazujące głównie na opublikowanych i recenzowanych artykułach naukowych (poz. 174 niepełny tytuł – prawdopodobnie wina programu do porządkowania literatury).

5. Uwagi krytyczne

Rozprawa doktorska ma postać monografii. Pomimo zachowania bardzo dużej rzetelności naukowej i bardzo dobrej znajomości interpretacji wyników i opisu metod, Autorka nie ustrzegła się kilku błędów, przykładowo:

- W opisie celu pracy zabrakło uzupełniania informacji co ma agregować oraz dlaczego podjęto badania w przepływie – odpowiedzi te jednak można uzyskać w klarowny sposób w dalszych rozdziałach rozprawy
- Opis dotyczący wpływu miedzi na organizm należałoby uzupełnić o mechanizm jej wydalania z organizmu oraz wskazanie, które narządy są najbardziej podatne na jej negatywne oddziaływanie.



- W przypadku planowanej publikacji fragmentów pracy, w postaci krótszych monografii tematycznej, zaleca się przeformułowanie rozdziału 3.3.2 z bardzo profesjonalnego języka, na łatwiejsze sformułowania (cel dydaktyczny).
- Niektóre opisy wzorów są niepełne (np. na str. 43) – brak numeracji utrudnia czytanie.
- Sformułowanie „komórki ssacze” (str. 48) należało zamienić na komórki ssaków.
- W przypadku wykresów, nie w pełni właściwy jest opis osi np. Rysunek 19 oś y nazwano liczbą pomiarów, a prawdopodobnie chodziło o liczbę cząstek w danym rozmiarze (lub ich udział procentowy). Kolejnym przykładem jest niewłaściwy opis osi y na Rysunku 26. Tu dodatkowo wskazane byłoby przedstawienie wyników pomiarowych względem liczności/objętości cząstek.
- Opis badanych nanocząstek należało przedstawić w formie kodowej.
- W mojej ocenie brakuje wprowadzenia do bardzo istotnych informacji zawartych na str. 151.

Pytania do Doktorantki:

- 1) Proszę przedstawić swój dorobek naukowy
- 2) Proszę wskazać najistotniejsze wyniki uzyskane z pomiarów synchrotronowych
- 3) Proszę o przedstawienie koncepcji, jakie inne płyny można było zastosować w badaniach przepływu oraz jakie wynikają trudności w ich analizie
- 4) Proszę przedstawić kilka zalet wykorzystania nanocząstek miedzi i cynku oraz ich tlenków.

Przedstawione powyżej uwagi nie umniejszają wartości merytorycznej przeprowadzonych prac badawczych. Redakcja pracy jest bardzo czytelna, ułatwia jej odbiór i w łatwy sposób umożliwia czytelnikowi poszukiwanie istotnych naukowo informacji. Co więcej, forma pracy przyjęta przez Autorkę umożliwia jej przyszłe wykorzystanie jako bardzo dobrego opracowania dydaktycznego zarówno w opisie wykorzystanych metod, jak i metodologii pomiarowej.



6. Ocena końcowa

Stwierdzam, że przeprowadzone przez P. mgr Karolinę Rucińską badania naukowe w trakcie realizacji rozprawy doktorskiej noszą bardzo istotne znamiona nowatorstwa oraz multidyscyplinarnego podejścia do poszukiwania mechanizmów powstawania chorób neurodegeneracyjnych, jak i tworzenia modeli oddziaływań nanocząstka – białko. Co więcej, bardzo istotnym aspektem było prowadzenie eksperymentów w układzie dynamicznym – w przepływie mikrofluidycznym.

Wysoko oceniam kompleksowe podejście do sformułowania i przedstawienia możliwego mechanizmu oddziaływania białko – cząstka, w kontekście wykorzystanej unikatowej aparatury badawczej.

Na szczególną uwagę zasługuje, jak już wspomniano, prowadzenie badań w wiodących polskich i zagranicznych ośrodkach badawczych, wykorzystujących promieniowanie synchrotronowe.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska zaprezentowała wiedzę teoretyczną kandydatki w dyscyplinie oraz uprawdopodobnia umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Pozytywnie oceniam rozprawę doktorską P. mgr Karoliny Rucińskiej pt.: „Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C”. Uważam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska są zgodne z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.

7. Konkluzja

Stwierdzam, że rozprawa doktorska P. mgr Karoliny Rucińskiej pt. „**Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C**” **spełnia wymogi stawiane rozprawom na stopień doktora zgodnie z art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce.** Na tej podstawie zwracam się do Rady Naukowej Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im.



Adama Mickiewicza o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Rucińskiej do dalszych etapów postępowania doktorskiego.

8. Wniosek o wyróżnienie

Badania przeprowadzone przez P. mgr Karolinę Rucińską obejmują bardzo istotne aspekty zachowania białek w modelowym układzie mikrofluidycznym i wpływ na nie wybranych struktur w nanorozmiarze. Podkreślić należy bardzo duży nakład pracy naukowej, uwidoczniony w rozprawie doktorskiej, o czym świadczą m.in. prace eksperymentalne prowadzone w renomowanych ośrodkach naukowych w Polsce i Europie (ESRF, DESY, NCPS Solaris, IFJ PAN w Krakowie). Doktorantka brała udział w projekcie badawczym OPUS. Na szczególne wyróżnienie zasługują również:

- wykorzystanie bardzo zaawansowanych technik badawczych w przeprowadzonych pracach badawczych (np. promieniowanie synchrotronowe);
- wykorzystanie modelowego układu mikrofluidycznego w badaniach nad możliwymi mechanizmami procesów neurodegeneracyjnych;
- prowadzenie badań multidyscyplinarnych wychodzących daleko poza obszar fizyki, biofizyki i nanotechnologii, zahaczając o chemię, biologię i medycynę, a także przyszłościowo i farmację (możliwość projektowania nowych struktur do aplikacji biomedycznych).
- zaproponowanie mechanizmu oddziaływania cząstka – białko.

Na tej podstawie wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej P. mgr Karoliny Rucińskiej.