

dr hab. Aneta Szymańska
profesor uczelni
Katedra Chemii Biomedycznej
Wydział Chemii
Uniwersytet Gdański

Gdańsk, 17.04.2026

RECENZJA

rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Rucińskiej pt. „Wpływ przepływu mikrofluidycznego oraz nanocząstek metalicznych na właściwości amyloidogenne ludzkiej cystatyny C”

Przedłożona mi do recenzji rozprawa doktorska, przygotowana pod opieką naukową prof. dr. hab. Macieja Kozaka w funkcji promotora oraz dr. Michała Taube jako promotora pomocniczego na Wydziale Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, podejmuje niezwykle aktualną i złożoną tematykę z pogranicza biofizyki, biochemii oraz toksykologii molekularnej. Głównym celem badawczym Autorki była próba zrozumienia mechanizmów agregacji ludzkiej cystatyny C (HCC) w obecności nanocząstek metalicznych, a konkretnie tlenku miedzi(II) (CuO), oraz w specyficznych warunkach hydrodynamicznych.

Motywacja podjęcia problemu badawczego zasługuje na szczególne uznanie z kilku powodów. Po pierwsze, Autorka trafnie osadza swoje badania w kontekście globalnego wyzwania zdrowotnego, jakim jest rosnąca zapadalność na choroby neurodegeneracyjne (m.in. chorobę Alzheimera czy Parkinsona). Słusznie zauważa, że współczesna nauka musi wyjść poza ramy czystej genetyki, kierując uwagę na czynniki środowiskowe. Wskazanie na ultradrobne cząstki metali, w tym tlenku miedzi, jako potencjalne modulatory stresu oksydacyjnego i agregacji białek, czyni tę pracę wysoce innowacyjną i potrzebną społecznie.

Po drugie, cennym aspektem recenzowanej rozprawy jest uwzględnienie środowiska fizycznego (przepływu) jako jednego z istotnych czynników mogących istotnie modulować procesy biochemiczne. Autorka słusznie argumentuje, że białka w organizmie nie funkcjonują w układach statycznych, lecz podlegają nieustannym siłom ścinającym w krwiobiegu czy płynie mózgowo-rdzeniowym. Połączenie analizy wpływu nanomateriałów z dynamiką przepływu nadaje pracy unikatowy charakter i znacząco przybliża uzyskane wyniki do warunków rzeczywistych (*in vivo*).

Realizacja tak zakreślonego celu badawczego wymagała od Autorki biegłości w operowaniu zaawansowaną aparaturą badawczą oraz umiejętności interpretacji wieloparametrowych wyników. Fakt, że praca powstała w renomowanym zespole prof. Macieja Kozaka na UAM, daje rękojmię najwyższej jakości metodologicznej, szczególnie w zakresie wykorzystania technik rozproszeniowych czy analizy stabilności makromolekuł. W niniejszej recenzji poddam analizie, w jaki sposób te ambitne założenia zostały przełożone na konkretne

wyniki eksperymentalne oraz jaki wkład wnoszą one do współczesnej fizyki medycznej i biologii strukturalnej.

Ambitne zamierzenia Autorki przełożyły się na obszerny, 178-stronnicowy manuskrypt, bogato ilustrowany graficznie wykresami i mikrofotografiami w sumarycznej liczbie 104 rysunków. Układ rozprawy charakteryzuje się logiczną strukturą, właściwą dla prac o charakterze interdyscyplinarnym. Treść została podzielona na dziewięć rozdziałów, które w sposób sekwencyjny przeprowadzają czytelnika przez proces badawczy – od zarysu teoretycznego, przez eksperyment po dyskusję uzyskanych wyników.

Pracę otwiera rozdział prezentujący przejrzyście zarysowany cel badawczy, z poprawnie postawioną hipotezą oraz planem eksperymentalnym, mającym doprowadzić do jej weryfikacji. Został on oparty na komplementarnym zastosowaniu szerokiego wachlarza technik biochemicznych, rozproszeniowych (SAXS, XRD, XAS), spektroskopowych (CD, UV-Vis, FTIR) oraz mikroskopowych (AFM, TEM), aż po zaawansowane narzędzia analityczne, takie jak mikrofluidyka czy nanospektroskopia FTIR (AFM-IR). Opanowanie tak szerokiego warsztatu badawczego przez naukowca na wczesnych etapach kariery, a lektura dalszej części pracy na to wskazuje, zasługuje na duże uznanie.

Cześć literaturową pracy poprzedza krótki rozdział przedstawiający przesłanki podjęcia wybranego problemu badawczego. Mimo swojej skrótości, w sposób wyczerpujący uzasadnia on motywację Autorki i racjonalnie pozycjonuje ją w kontekście dotychczasowego stanu wiedzy. Odnosi się to nie tylko do bezpośredniego przedmiotu rozprawy – ludzkiej cystatyny C – ale również do szerszego tła naukowego, w tym uwarunkowań środowiskowych procesów amyloidogenezy.

By odpowiednio przygotować czytelnika do lektury najważniejszej części pracy, czyli opisu badań eksperymentalnych i analizy ich wyników, w kolejnych rozdziałach Autorka przedstawia, w mniej lub bardziej szczegółowy sposób, stan wiedzy dotyczący chorób neurodegeneracyjnych, właściwości nanocząstek (ze szczególnym uwzględnieniem miedzi czy cynku) oraz charakterystykę ludzkiej cystatyny C. Tę część wprowadzenia zamykają podrozdziały poświęcone roli metali w procesach neurodegeneracyjnych oraz wpływowi przepływu naczyniowego na agregację białek. Literatura przedmiotu dotycząca dwóch pierwszych zagadnień jest bardzo obszerna, a liczba publikacji dotyczących oddziaływania nanocząstek na ekosystemy i zdrowie człowieka notuje w ostatnich latach gwałtowny wzrost. Poruszanie się w tak bogatym zbiorze informacji stanowi wyzwanie, i może to tłumaczy, dlaczego Autorka, w części prezentującej choroby neurodegeneracyjne, zdecydowała się na zacytowanie takich, a nie innych publikacji. Warto jednak czasem sięgnąć po nowsze opracowania. W podrozdziałach dotyczących nanocząstek i ich powiązań z patologiami układu nerwowego mgr Rucińska sięga już po opracowania bardzo aktualne (z ostatnich 2–3 lat), uwzględniając przy tym aspekty demograficzne i geograficzne.

Bardzo satysfakcjonująca jest lektura rozdziału dotyczącego cystatyny C. Jako osoba od lat zajmująca się tym białkiem przyjemnością skonstatowałam, że Autorka w sposób kompetentny i uporządkowany zebrała kluczowe informacje na temat tego białka, łącząc ujęcie historyczne

z najnowszymi doniesieniami literaturowymi. Dwa ostatnie rozdziały części teoretycznej, omawiające rolę miedzi i cynku oraz wpływ procesów przepływowch, mają charakter bardziej syntetyczny. O ile skrótowe ujęcie roli jonów metali jest uzasadnione – nie stanowiły one głównego przedmiotu badań – o tyle szersze omówienie zagadnień mikroprzepływów byłoby, moim zdaniem, korzystne dla pełniejszego wprowadzenia czytelnika w ten istotny czynnik, pozwalający na lepsze odwzorowanie warunków *in vivo* w badaniach modelowych. Pewną sugestią redakcyjną mogłoby być ograniczenie opisów podstaw teoretycznych rutynowych technik analitycznych (takich jak spektroskopia UV-Vis, fluorescencja czy CD), które i tak zostały przedstawione w sposób bardzo ogólny. Rezygnacja z tych fragmentów pozwoliłaby na szersze omówienie wspomnianej mikrofluidyki, której poświęcono jedynie około pół strony, bez zwiększania objętości pracy, .

W kolejnym rozdziale Doktorantka przedstawiła opis procedur eksperymentalnych zastosowanych w pracy. Wykaz obejmujący 20 pozycji świadczy o bardzo szerokim warsztacie badawczym. Należy jednak zauważyć, że Autorka nie stosuje formy osobowej w opisach, co utrudnia jednoznaczną ocenę jej bezpośredniego zaangażowania w realizację poszczególnych zadań. Choć w przeważającej części opisy procedur są poprawne, w kilku punktach zabrakło istotnych danych technicznych, które wymieniam poniżej:

1. Elektroforeza białek: Brak informacji o stężeniach żeli (zagęszczającego i rozdzielającego) oraz o składzie mediów stosowanych w procesie. Podane parametry buforu elektrodowego (30 g Tris base, 144 g glicyny i 10 g SDS) są niepełne, gdyż nie określono objętości, w jakiej rozpuszczono wymienione odczynniki. Brakuje również danych dotyczących zastosowanego markera masy białkowej.
2. Badania spektroskopowe: W opisie obróbki danych nie podano parametrów wygładzania widm metodą Savitzky'ego-Golaya.
3. Analiza stabilności termicznej: Brak specyfikacji gradientu temperatury oraz wyraźnej informacji o samym procesie ogrzewania próbek białkowych.
4. Pomiar spektrofotometryczne: Nie podano składu chemicznego buforu o pH 4.
5. Badania z wykorzystaniem linii komórkowych: W opisie procedur zabrakło informacji o standardowych warunkach hodowli komórek (np. skład pożywki, temperatura, stężenie CO₂, wilgotność).

Prezentacja wyników w rozdziale szóstym zachowuje ciągłość przyczynowo-skutkową. Autorka rozpoczyna od charakterystyki fizykochemicznej substratów (nanocząstek CuO i białka HCC), by następnie przejść do opisu ich wzajemnych oddziaływań oraz wynikających z nich konsekwencji na poziomie molekularnym i komórkowym. Analiza otrzymanych wyników jest bogato ilustrowana, co znacząco ułatwia śledzenie wywodu Doktorantki i weryfikację przedstawianych informacji. Autorka sprawnie porusza się w dużej ilości danych

eksperymentalnych, poddając je wnikliwej i krytycznej analizie. Warto podkreślić, że dla części badań przeprowadzono analizy statystyczne, co dodatkowo wzmacnia wiarygodność i znaczenie naukowe uzyskanych rezultatów.

Kluczowy segment wyników stanowią badania nad wpływem przepływu mikrofluidycznego na procesy amyloidogenezy, co stanowi próbę zbliżenia modelu *in vitro* do warunków fizjologicznych. Analizę wpływu parametrów środowiskowych (obecność nanocząstek, pH, mikroprzepływ) na kinetykę agregacji oraz morfologię powstających struktur Autorka rozszerzyła o badania struktury drugorzędowej przy zastosowaniu zaawansowanych technik, takich jak nano-IR, a także o testy na liniach komórkowych. Tak szerokie podejście badawcze pozwoliło na zaproponowanie interesującego modelu mechanizmu agregacji cystatyny C, który w sposób logiczny porządkuje zgromadzony materiał eksperymentalny w spójną całość, stanowiąc jednocześnie istotne uzupełnienie modeli dotychczas istniejących. Do pełnego obrazu zabrakło mi zabrakło badań cytotoksyczności agregatów generowanych w warunkach przepływu mikrofluidycznego. Porównanie wyników dla agregatów otrzymanych w różnych warunkach miałoby zdecydowanie dużą wartość naukową. Byłoby to tym bardziej interesujące, że w badaniach mikroskalowych (nanoIR) wykazano różnice w procesie agregacji i morfologii strukturalnej otrzymanych struktur.

Do niewątpliwych atutów pracy należą jej multidyscyplinarność i komplementarność zastosowanych metod. Autorka sprawnie połączyła wyniki uzyskane za pomocą skrajnie różnych technik (od fizykochemicznych: SAXS, XRD, po biologiczne: testy WST-1, ROS). Istotne jest również wyjście poza statyczne modele *in vitro* i wprowadzenie przepływu jako czynnika modyfikującego agregację. Autorka wykazała udział sił ścinających jako ważnego parametrów fizjologicznych, co nadaje przedstawionym badaniom walor biomimetyczny.

Na koniec chciałabym kilka słów poświęcić stronie redakcyjnej rozprawy. Jak już wspominałam, rozprawa jest obszerna, liczy 178 stron. Pod względem edycyjnym jest poprawna, liczba błędów interpunkcyjnych czy stylistycznych lokuje się w dolnych rejestrach współczesnych statystyk. Najpowszechniejszym niedopatrzaniem redakcyjnym jest brak konsekwencji w stosowaniu przerwy między zakończeniem wyrazu a nawiasem cytowania literaturowego (raz jest, raz nie ma). W tekście pojawiają się również określenia wywodzące się z żargonu laboratoryjnego

(np. na str. 31 – „10 aminokwasów” zamiast poprawnego merytorycznie sformułowania „10 reszt aminokwasowych”) oraz kalki z języka angielskiego (np. niefortunne określenie struktury jako „zakrętu” zamiast „zwrotu” – ang. *turn*). Należy także zwrócić uwagę na termin „fibryla”, który zarówno w liczbie pojedynczej, jak i mnogiej, powinien być odmieniany zgodnie z rodzajem żeńskim. Dobrym rozwiązaniem byłoby umieszczenie w rozprawie spisu skrótów i symboli bądź konsekwentne stosowanie praktyki jednokrotnego rozwijania danego skrótowca przy jego pierwszym użyciu. W obecnej wersji pracy rozwinięcia te (np. dla AD – *Alzheimer's Disease*) pojawiają się wielokrotnie w przypadkowych miejscach. Zauważyć należy również niefortunne sformułowanie tytułu podrozdziału 5.14 – określenie „testy z użyciem

fluorescencyjnego czytnika płytek” nie jest nazwą metody badawczej, lecz wskazaniem narzędzia pomiarowego.

Do rozprawy wkradły się również błędy merytoryczne wymagające sprostowania:

- str. 16: W opisie amyloidozy typu islandzkiego Autorka błędnie podaje, że w ścianach naczyń krwionośnych odkłada się peptyd -amyloidowy, podczas gdy w tej jednostce chorobowej odkłada się ludzka cystatyna C. Genetyczna postać związana z beta-amyloidem to odmiana holenderska, nie islandzka.

- str. 50: Chromatografia FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*) została sklasyfikowana jako technika wysokociśnieniowa, podczas gdy w rzeczywistości jest to technika średniociśnieniowa (w odróżnieniu od HPLC).

Chciałabym również poprosić Doktorantkę o ustosunkowanie się do następujących kwestii:

1. Metodyka sterylizacji pożywek (str. 49): Z jakiego powodu pożywkę do hodowli bakteryjnej poddawano sterylizacji przez pełną godzinę? Czy tak długi czas ekspozycji na wysoką temperaturę i ciśnienie nie wpłynął negatywnie na właściwości odżywcze komponentów pożywki?
2. Parametry syntezy nanocząstek (str. 52): Proszę o doprecyzowanie opisu eksperymentu, w którym roztwór wodny 0,2 M octanu miedzi z dodatkiem kwasu octowego był „podgrzewany do wrzenia w temperaturze około 240°C”. Biorąc pod uwagę fizykochemię roztworów wodnych pod ciśnieniem atmosferycznym, w jaki sposób mierzona była wspomniana temperatura?
3. Analiza stabilności termicznej białek (str. 55): Dlaczego do oceny stabilności termicznej zdecydowano się na metodę z użyciem barwnika fluorescencyjnego (np. *Thermal Shift Assay*), zamiast technik bezpośrednio monitorujących strukturę drugorzędową, jak dichroizm kołowy (CD)? Ponadto proszę o wyjaśnienie, jak Doktorantka interpretuje zjawisko obniżania się sygnału barwnika wraz ze wzrostem temperatury oraz jak uzyskane wyniki denaturacji w obecności jonów miedzi (II) korelują z danymi przedstawionymi w pracy Żygowskiej i wsp. (*FEBS J.*, 2024), których zabrakło w dyskusji?
4. Strona graficzna rozprawy: W jaki sposób i przy użyciu jakich narzędzi przygotowano infografiki przedstawione na rysunkach 1, 2, 3, 5, 9, 10, 12, 13 oraz 104?

Podsumowując, przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Karoliny Rucińskiej stanowi wartościowe i kompleksowe studium nad wpływem nanocząstek tlenku miedzi oraz warunków mikroprzepływowych na procesy agregacji ludzkiej cystatyny C. Autorka wykazała się umiejętnością łączenia zaawansowanych technik fizykochemicznych z metodami biologicznymi, co pozwoliło na zaproponowanie spójnego i dobrze udokumentowanego mechanizmu oddziaływań na granicy faz nanomateriał–białko.

Mimo wskazanych w recenzji drobnych uchybień redakcyjnych oraz konieczności doprecyzowania niektórych aspektów metodycznych, praca wnosi istotny wkład do wiedzy o środowiskowych uwarunkowaniach amyloidogenezy. Wysoka jakość prezentacji wyników, wnikliwa analiza danych oraz innowacyjne podejście do modelowania warunków *in vivo* przy użyciu układów mikrofluidycznych świadczą o dużej dojrzałości naukowej Doktorantki.

Konkludując, stwierdzam, że przedmiotowa rozprawa doktorska spełnia z nawiązką ustawowe wymagania stawiane pracom doktorskim. W związku z powyższym, zwracam się do Rady Naukowej Dyscyplin Nauki Fizyczne i Astronomia Wydziału Fizyki i Astronomii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu z wnioskiem o dopuszczenie mgr Karoliny Rucińskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.