

Streszczenie pracy doktorskiej lek. Anny Lizoń pt.: „*Nanocząstki srebra jako narzędzie do badania oddziaływań międzybiałkowych*”

Nanocząstki metali szlachetnych ze względu na swoje wyjątkowe właściwości optyczne, chemiczne i fototermiczne są coraz powszechniej wykorzystywane w medycynie. W oparciu o nanotechnologię rozwija się diagnostyka laboratoryjna, diagnostyka obrazowa, doskonalone są metody terapeutyczne.

Nanocząstki w specyficzny, zależny od ich budowy i cech fizykochemicznych sposób oddziałują z biomolekułami, a szczególnie białkami. Stwarza to możliwość wykorzystania nanocząstek do badania oddziaływań między białkami. Oddziaływania te są niezwykle istotne m.in. w przypadku rozwoju ciężkich chorób związanych z tworzeniem i odkładaniem się w tkankach depozytów białkowych (amyloidozy). Niektóre nieprawidłowo pofalldowane białka (np. wolne monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin - FLC) mają tendencję do tworzenia fibryli lub amorficznych agregatów. Obecnie nie jest znana technika pozwalająca na identyfikację amyloidogennych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Opracowanie takiej metody pozwoliłoby na wczesne wyselekcjonowanie pacjentów podwyższonego ryzyka i wdrożenie skutecznego leczenia.

Celem pracy była próba zastosowania nanocząstek srebra (AgNPs) do badania oddziaływań międzybiałkowych. W pierwszym etapie opracowano parametry układu w oparciu o model antygen (FLC) – przeciwciało. W drugim etapie, zweryfikowaną metodykę próbowano wykorzystać do badania procesu spontanicznej agregacji wolnych monoklonalnych łańcuchów lekkich immunoglobulin. Oceniono też użyteczność różnych technik badawczych do śledzenia procesu agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek.

Materiałem wykorzystanym w pracy były komercyjnie dostępne przeciwciała, oczyszczone monoklonalne łańcuchy lekkie immunoglobulin pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowaną gammapatią monoklonalną lub białkomoczem Bence-Jonesa oraz mocze od pacjentów z białkomoczem Bence-Jonesa. Do oceny procesu agregacji opłaszczonych białkami nanocząstek użyto: spektrofotometrię UV/Vis, obrazowanie metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM), dynamiczne rozpraszanie światła (DLS) oraz autorską metodę rozpraszania światła laserowego.

W wyniku syntezy zmodyfikowaną metodą Creightona otrzymano nanocząstki srebra stabilizowane cytrynianem podatne na funkcjonalizację zarówno przeciwciałami jak i wolnymi

łańcuchami lekkimi immunoglobulin. W określonym zakresie stężeń opłaszczone przeciwciałami nanocząstki srebra w obecności komplementarnego antygeny ulegały agregacji. Procesowi temu towarzyszyły zmiany widma powierzchniowego rezonansu plazmonowego LSPR. Proces agregacji nanostruktur potwierdzono metodą transmisyjnej mikroskopii elektronowej, dynamicznego rozpraszania światła laserowego oraz autorską metodą bezpośredniej obserwacji światła laserowego.

Zastosowane w pracy metody śledzenia reakcji agregacji funkcjonalizowanych przeciwciałami nanocząstek: spektrofotometria UV/Vis, obrazowanie TEM, DLS oraz autorska metoda analizy wzorców rozpraszanie światła laserowego dały całościowo spójne wyniki. Jednak każda z tych metod ma pewne ograniczenia wynikające m.in. ze sposobu przygotowania próbki do badania czy też samej metodologii badania. Opracowana w niniejszej pracy autorska metoda z bezpośrednią analizą rozpraszaniem światła laserowego przyniosła dobre wyniki. Różne wzorce rozpraszania pokrywały się z wynikami uzyskanymi innymi metodami.

W drugim etapie pracy badano oddziaływania różnych klonów monoklonalnych wolnych łańcuchów lekkich immunoglobulin opłaszczonych na nanocząstkach srebra. Wykazano, że różne klony łańcuchów lekkich immunoglobulin zachowują się odmiennie. Niektóre klony samoistnie wywoływały agregację nanocząstek, a w przypadku innych układ robił się hiperstabilny. Wynika to prawdopodobnie ze struktury samych łańcuchów i być może koreluje z tendencją do tworzenia depozytów. Nie jest wykluczone, że adsorpcji FLC na nanocząstkach srebra towarzyszyły zmiany konformacyjne stymulujące powstawanie lub odsłaniające strukturę β -kartki, a tym samym inicjujące agregację białek.

Podsumowując, nanocząstki srebra są użytecznym narzędziem do badania oddziaływań międzybiałkowych. Otrzymane w pracy wyniki mogą być podstawą dalszych badań obejmujących materiał biologiczny pochodzący od chorych ze zdiagnozowaną AL amyloidozą lub innymi chorobami, w których dochodzi do tworzenia depozytów białkowych.