



Prof. dr hab. inż. Jakub D. Rybka
Centrum NanoBioMedyczne
Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu
Ul. Wszechnicy Piastowskiej 3
61-614 Poznań
e-mail: jrybka@amu.edu.pl

Poznań, 20.10.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Adama Krzysztofa Kowalskiego
pt. „Hybridization Reactions in Aqueous Systems:
Towards Automated Measurements”
wykonanej pod kierunkiem prof. dr hab. Roberta Hołysta
oraz dr inż. Grzegorza Bubaka
w Warszawskiej Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Biomedycznych
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

1. Ocena formalna rozprawy

Pod względem formalnym, rozprawa stanowi opracowanie liczące 96 (82) stron. Napisana jest w języku angielskim i zawiera elementy, które powinny znaleźć się w rozprawie doktorskiej, tj. Listę publikacji, Streszczenie w języku polskim oraz abstrakt w języku angielskim, Wstęp, Materiały i Metody, Wyniki i Dyskusję, Podsumowanie oraz Bibliografię. W pracy brakuje wykazu skrótów, tabel i rycin, ale nie wpływa to na odbiór i czytelność przekazu. Bibliografię stanowi 117 pozycji. Wyniki zostały zilustrowane za pomocą 38 rycin i 1 tabeli. Praca napisana oraz zedytowana jest na bardzo wysokim poziomie.

Wyartykułowanie celu pracy z podziałem na cele szczegółowe z pewnością zwiększyłoby przejrzystość pracy.

Na podstawie bazy Google Scholar (odnośnik znajduje się w pdfie pracy), pan Adam Kowalski jest autorem trzech publikacji, jego index Hirscha to 2 a ilość cytowani to 13.

Cztery prace stanowią część przedłożonej dysertacji. Na moment składania pracy 2 były opublikowane, a 3 złożone w czasopiśmie. Do momentu pisanie tej recenzji opublikowana została trzecia praca w prestiżowym czasopiśmie Chemical Engineering Journal.



2. Ocena celu rozprawy i trafności tematu

Celem pracy jest zbadanie wpływu warunków środowiska zewnętrznego (takich jak siła jonowa, pH i zatłoczenie molekularne) na przebieg i równowagę reakcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych (DNA-DNA), opracowanie teoretycznych modeli opisujących te zjawiska, a także zaprojektowanie i zastosowanie zautomatyzowanej platformy mikroprzepływowej usprawniającej pomiary stałej równowagi hybrydyzacji.

Praca ma dwa główne cele:

Poznawczy – zrozumienie mechanizmów i czynników wpływających na hybrydyzację DNA w różnych warunkach środowiskowych, uwzględniając efekty elektrostatyczne i zatłoczenie molekularne.

Aplikacyjny – opracowanie nowej, zminiaturyzowanej i zautomatyzowanej metody pomiarowej (platformy mikroprzepływowej), która pozwala szybciej, dokładniej i przy mniejszym zużyciu reagentów badać reakcje hybrydyzacji.

Część tematu „**Hybridization Reactions in Aqueous Systems**” trafnie odnosi się do głównego tematu pracy — badania reakcji hybrydyzacji DNA w środowisku wodnym, z uwzględnieniem wpływu takich czynników jak pH, siła jonowa czy zatłoczenie molekularne, natomiast „**Towards Automated Measurements**” odnosi się bezpośrednio do trzeciej części pracy, w której zaprezentowano platformę mikroprzepływową automatyzującą proces pomiarowy.

Aplikacyjny wymiar pracy (trzecia część), stanowi bardzo interesujący element dzieła.

3. Ocena merytoryczna rozprawy

Wprowadzenie do tematyki

Wstęp (30 stron) został podzielony jest na 6 rozdziałów i zawiera 15 czytelných rycin. Rodział stanowi przegląd kluczowych zagadnień stanowiących podstawę niniejszej pracy. Na początku omówiono budowę, oddziaływanie oraz zastosowania kwasów nukleinowych. Następnie przedstawiono zjawisko zatłoczenia molekularnego i jego wpływ na interakcje biomolekuł. Kolejne części opisują zasady chemii fizycznej umożliwiające określenie siły oddziaływań kwasów nukleinowych w stanie równowagi oraz ich szybkości asocjacji. W dalszej części wprowadzone zostało zjawisko fluorescencji jako podstawowe narzędzie analityczne, ze szczególnym uwzględnieniem technik fluorescencyjnych wykorzystanych w badaniach hybrydyzacji DNA-DNA. Na zakończenie zaprezentowano koncepcję mikroprzepływów jako podejście typu *lab-on-a-chip*, mające na celu zwiększenie przepustowości pomiarów oraz ograniczenie zużycia odczynników.



Materiały i Metodyka badawcza

Opis jest krótki ale zawiera wszystkie niezbędne elementy opisane na 6 stronach oraz 3 rycinach. Opis metod ograniczony został w zasadzie tylko do opisu mikroskopii konfokalnej oraz mikrofluidyki.

Wyniki i ich omówienie

Część wynikowa podzielona jest na 3 podrozdziały. Wyniki pracy przedstawiają kompleksową, ilościową i mechanistyczną analizę reakcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych w środowisku wodnym, ukazując, w jaki sposób skład chemiczny i warunki fizyczne wpływają na parametry termodynamiczne i kinetyczne procesu.

Pierwsza część opisuje kinetykę asocjacji oligonukleotydów DNA w środowisku wodnym, jonowym i katalizowanym oraz przedstawia model wyjaśniający przyspieszenie reakcji między jednoimiennie naładowanymi nićmi DNA w obecności przeciwnie naładowanych cząsteczek w roztworze.

W pierwszej części wykazano, że wprowadzenie dodatnio naładowanych katalizatorów (od prostych monomerów po polimery i micelle) znacząco, nawet o kilka rzędów wielkości, przyspiesza reakcję hybrydyzacji w porównaniu z tradycyjnymi buforami jonowymi. Zjawisko to wynika z elektrostatycznego przyciągania pomiędzy katalizatorem a ujemnie naładowanymi nićmi DNA, które zwiększa ich lokalne stężenie i ułatwia tworzenie dupleksów. Opracowany w pracy model fizyczny ilościowo opisuje zależność pomiędzy ładunkiem i rozmieszczeniem ładunku katalizatora a obserwowanym przyspieszeniem reakcji, pokazując, że szybkość hybrydyzacji można regulować poprzez odpowiedni dobór środowiska reakcji.

Druga część opisuje oddziaływania DNA-DNA w stanie równowagi w obecności kationów jednowartościowych i czynników zatłaczających oraz analizuje wpływ interakcji między jonami a cząsteczkami zatłaczającymi na proces hybrydyzacji, przedstawiając następnie model fenomenologiczny opisujący efekty zatłoczenia molekularnego.

W drugiej części wykazano, że równowaga reakcji hybrydyzacji DNA w obecności czynników zatłaczających ma charakter nieliniowy. Przy umiarkowanym zatłoczeniu siły wyczerpania sprzyjają tworzeniu dupleksów, zwiększając stałą równowagi reakcji, natomiast przy wyższych stężeniach czynników zatłaczających przeważa efekt destabilizacji struktury DNA, co prowadzi do spadku powinowactwa wiązania. Opracowany model fenomenologiczny opisuje te zależności i pozwala przewidywać zarówno wzrost, jak i spadek wartości stałej równowagi w zależności od stopnia zatłoczenia.



Ostatnia część (z mojej perspektywy najistotniejsza część pracy doktorskiej) przedstawia opracowanie i działanie platformy mikroprzepływowej służącej do półautomatycznych pomiarów interakcji biomolekuł na przykładzie hybrydyzacji DNA-DNA, a także opisuje proces jej walidacji oraz porównanie przepustowości z metodą standardową.

W trzeciej części zaprezentowano platformę mikroprzepływową, która umożliwia półautomatyczne i znacznie szybsze pomiary równowagi hybrydyzacji kwasów nukleinowych. System integruje przygotowanie, mieszanie i analizę próbek w jednym układzie, redukując czas pomiaru pojedynczej wartości stałej równowagi o około 3 godziny. Dodatkowo platforma ogranicza zużycie odczynników około 2000-krotnie, eliminuje potrzebę stosowania jednorazowych płytek wielodołkowych i zwiększa powtarzalność pomiarów poprzez minimalizację błędów ludzkich.

Łącznie uzyskane wyniki tworzą spójne i przewidywalne ramy teoretyczne umożliwiające kontrolowanie reakcji hybrydyzacji kwasów nukleinowych poprzez odpowiedni dobór warunków środowiskowych. Opracowane modele i platforma mikroprzepływowa stanowią istotny krok w kierunku automatyzacji i zwiększenia wydajności badań nad interakcjami biomolekuł, z potencjalnym zastosowaniem w diagnostyce, odkrywaniu leków i biologii systemów.

Chciałbym uzyskać odpowiedzi na parę pytań po lekturze tej ciekawej pracy:

Czy podobne mechanizmy przyspieszenia hybrydyzacji obserwowane dla DNA można zaobserwować również w przypadku RNA lub hybryd DNA-RNA, i jak różnice strukturalne między nimi wpływają na efektywność katalizy?

W jaki sposób można wykorzystać opracowany model fenomenologiczny do przewidywania zachowania kwasów nukleinowych w środowisku komórkowym, gdzie zatłoczenie molekularne i warunki jonowe są znacznie bardziej złożone?

Czy platforma mikroprzepływowa może zostać zaadaptowana do badań innych typów interakcji biomolekularnych (np. białko-DNA, białko-RNA, ligand-receptor), a jeśli tak, jakie modyfikacje byłyby konieczne?

Jak opracowane modele i rozwiązania technologiczne mogą zostać wykorzystane w praktycznych zastosowaniach, takich jak diagnostyka molekularna, detekcja patogenów lub screening leków opartych na oligonukleotydach?



4. Uwagi końcowe

Rozprawa doktorska Pana mgr Adama Kowalskiego pt.: „Hybridization Reactions in Aqueous Systems: Towards Automated Measurements” wnosi do nauki elementy poznawcze i ma istotne znaczenie dla praktyki. Doktorant wykazała się dużą inwencją naukową i techniczną przy planowaniu i realizacji prac badawczych, w stopniu zapewniającym możliwość samodzielnego prowadzenia badań naukowych.

Podsumowując, stwierdzam, że praca spełnia wymogi stawiane rozprawom doktorskim, w szczególności odpowiada warunkom określonym w art. 13 ustawy z dnia 14 marca 2003 o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. Nr 65, poz. 595) i **wnoszę o dopuszczenie pana Adama Kowalskiego do publicznej obrony.**

Biorąc pod uwagę poziom naukowy oraz wysoki aspekt aplikacyjny wnoszę o wyróżnienie rozprawy doktorskiej pana Adama Kowalskiego.