

Warszawa, 17 października 2025

Recenzja rozprawy doktorskiej

Pana mgr. inż. Adama Krzysztofa Kowalskiego

pt.: Hybridization Reactions in Aqueous Systems: Towards Automated Measurements

wykonanej pod opieką prof. dr. hab. Roberta Hołysta
oraz dr. inż. Grzegorza Bubaka
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

Pan **mgr Adam Kowalski** ukończył studia I i II-go stopnia na Politechnice Warszawskiej na kierunku Technologia Chemiczna, specjalność Nanomateriały i Nanotechnologie. W lipcu 2021 obronił pracę magisterską wykonaną pod opieką prof. Tomasza Klisia dotyczącą określenia wpływu środków powierzchniowo czynnych na kinetyki reakcji biochemicznych. Po obronie pracy magisterskiej, Pan Adam Kowalski rozpoczął trzeci stopień kształcenia w Warszawskiej Szkole Doktorskiej Nauk Ścisłych i Biomedycznych, w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie. Kończącym efektem tego etapu kształcenia jest przedłożona do recenzji rozprawa doktorska pt.: „**Hybridization Reactions in Aqueous Systems: Towards Automated Measurements**”, wykonana pod opieką prof. dr. hab. Roberta Hołysta oraz dr. inż. Grzegorza Bubaka. Praca doktorska Pana Kowalskiego napisana jest, w oparciu o dwie opublikowane w 2022r publikacje naukowe, które ukazały się w *Nature Communications* oraz w *The Journal of Physical Chemistry Letters*, a więc w bardzo prestiżowych czasopismach naukowych, oraz dwa artykuły zgłoszone do czasopism. W pracy z *Nature Communications* Doktorant jest pierwszym autorem. Ponadto, w dorobku naukowym p. Kowalskiego znajduje się jeszcze jeden artykuł również zgłoszony do publikacji w czasopiśmie z listy filadelfijskiej oraz pięć komunikatów na międzynarodowych konferencjach.

Recenzowana praca doktorska dotyczy **badania kinetyk reakcji hybrydyzacji DNA, wpływu różnych czynników (pH, siła jonowa, zatłoczenie molekularne) na ich stan równowagi oraz zastosowania technik mikroprzepływowych do istotnego usprawnienia prowadzenia tego typu pomiarów.**

Rozprawa doktorska Pana Adama Kowalskiego napisana jest w języku angielskim, podzielona jest na cztery główne rozdziały i obejmuje 82 strony. Przed streszczeniami Autor umieścił spis publikacji naukowych, których jest współautorem, przy czym, jak wspomniałem wyżej, trzy z nich nie zostały jeszcze opublikowane. Na końcu tego spisu Doktorant umieścił zdanie – cytuję: „**Publications 1,2,3 and 4 are part of this dissertation**”, co wg mnie sugeruje, że dysertacja ma charakter tzw. „Cyklu artykułów naukowych” autorstwa doktoranta z odpowiednimi oświadczeniami współautorów etc. Tak jednak nie jest, ponieważ w rozprawie, którą w formie monografii otrzymałem do recenzji, Doktorant tych prac nie zamieścił. Ponadto, „publikacje” 3 i 4 ze spisu na stronie V nie zostały jeszcze opublikowane więc trudno je traktować jako część dorobku Doktoranta, na podstawie którego mógłby on przygotować rozprawę o charakterze cyklu spójnych tematycznie publikacji z jego wiodącym udziałem. W tym miejscu poprosiłbym Doktoranta o wyjaśnienie cytowanego zapisu.

Po streszczeniach w języku polskim i angielskim, Autor umieścił część teoretyczną pracy, w której cytuje łącznie 90 pozycji literaturowych. **Rozdział 1** to 30 stronicowe wprowadzenie w obszar kwasów nukleiniowych - ich budowy, struktury, funkcji, najważniejszych zastosowań oraz wzajemnych oddziaływań ze szczególnym uwzględnieniem wpływu tzw. zatłoczenia molekularnego. Podrozdział 1.2 Doktorant poświęcił właśnie przybliżeniu czytelnikowi zagadnień z obszaru oddziaływań biocząsteczek w środowiskach o ograniczonej objętości i wysokich stężeniach indywiduów chemicznych. Przykładem takiego środowiska może być wnętrze żywej komórki, w którym parametry takie jak lepkość, zmiany pH, wysokie stężenia, zmiany współczynników dyfuzji mogą istotnie wpływać m.in. na równowagę i wydajność reakcji biochemicznych lub prowadzić np. do agregacji białek, nieprawidłowego ich fałdowania lub tworzenia biokompleksów. Mgr. Kowalski zwrócił również uwagę na różne stężenia wagowe czynników powodujących efekt zatłoczenia molekularnego. Na podstawie cytowanej literatury wskazał, że dla stężeń poniżej 15% wag. konsekwencje zagęszczenia molekularnego są regulowane przede wszystkim przez siły wyczerpania, które powodują lokalne zmiany ciśnienia osmotycznego prowadzące do zbliżania się biomolekuł, co może sprzyjać np. ich asocjacji lub np. stabilizować zhybrydyzowane nici DNA. W takich warunkach stałe równowagi reakcji hybrydyzacji mogą wzrosnąć dziesięciokrotnie, a gdy stłoczenie molekularne jest większe (stężenia powyżej 15% wagowych) ich wartości potrafią spadać nawet o 3 rzędy wielkości. Tu Autor wskazuje na istotną rolę tzw. efektów destabilizujących wywołanych zwiększoną lepkością, przeszkodami sterycznymi, zmniejszoną dyfuzją, zwiększonymi oddziaływaniami o charakterze hydrofobowym, zmianami konformacyjnymi, bezpośrednimi oddziaływaniami reagentów z czynnikami wywołującymi efekt zatłoczenia molekularnego, obniżeniem stałej dielektrycznej etc. Kolejnym czynnikiem, na który zwrócił uwagę Doktorant to oddziaływania elektrostatyczne, nabierające w zatłoczonym molekularnie środowisku kluczowego znaczenia. Mogą one

np. lokalnie zmieniać wartość siły jonowej, intensyfikować tworzenie się kompleksów przeciwnie naładowanych biocząstek (białko – DNA), lub hamować asocjację cząstek o podobnych ładunkach. Niektóre czynniki odpowiedzialne za efekt stłoczeniowy, poprzez wiązanie np. jonów sodowych, mogą także modulować poszczególne oddziaływania. Na zakończenie tego podrozdziału Doktorant podkreślił duże znaczenie zrozumienia efektu zatłoczenia molekularnego w pełnym zakresie stężeń, co mogłoby pomóc np. (i) w projektowaniu efektywnych metod diagnostycznych opartych na reakcjach hybrydyzacji; (ii) projektowaniu nowych leków; (iii) symulacjach środowisk wewnątrzkomórkowych w pracach nad otrzymaniem sztucznych komórek.

W kolejnych podrozdziałach części literaturowej (1.3.1 i 1.3.2) Doktorant wyjaśnia pojęcia stałej równowagi reakcji chemicznej, kinetyki reakcji chemicznej, uwzględniając odwracalną reakcję hybrydyzacji pojedynczych nici DNA jako reakcji typu $A+B \rightleftharpoons AB$. Przytacza również stosowne równania termodynamiczne, które po odpowiednich przekształceniach pozwalają w dość prosty sposób wyznaczyć stałą równowagi reakcji hybrydyzacji np. technikami wykorzystującymi zjawisko fluorescencji, które w Podrozdziale 1.4 jest także opisane na podstawie diagramu Jabłońskiego oraz wykresu, obrazującego tzw. przesunięcie Stokesa. Dalej krótko omówione są najważniejsze techniki analityczne, które Pan Kowalski wykorzystywał w swoich badaniach: mikroskopia fluorescencyjna i konfokalna oraz techniki bardziej zaawansowane takie jak: analiza jasności molekularnej (MBA), technika transferu energii rezonansu Förstera (FRET) oraz analiza korelacji fluorescencji (FSC). O ile umieszczenie w pracy doktorskiej opisu zaawansowanych technik MBA, FRET, FSC wydaje się być konieczne, ponieważ nie we wszystkich laboratoriach są one dostępne, o tyle (moim zdaniem) omawianie podstaw samego zjawiska fluorescencji i przedstawianie diagramu Jabłońskiego w pracy doktorskiej mogłoby śmiało być pominięte, ponieważ te informacje dostępne są w dowolnym podręczniku lub skrypcie do chemii analitycznej.

Podrozdział 1.6 to zwięzły opis mikrofluidyki, w którym Doktorant przytacza i wyjaśnia najważniejsze pojęcia związane z technikami mikroprzepływowymi, wskazuje na kluczowe zalety mikrosystemów przepływowych (niskie wartości liczby Reynoldsa, duży stosunek powierzchni do objętości, możliwość precyzyjnej kontroli objętości cieczy poprzez np. budowę systemów kroplowych, możliwość generowania pasywnego przepływu cieczy bez konieczności stosowania różnego rodzaju pomp oraz np. stosowanie pola elektrycznego do kontroli / wspomagania operacji jednostkowych na pojedynczych kroplach i kilka innych). Technologie wytwarzania mikroukładów przepływowych opisane są dosłownie w trzech zdaniach a ich zastosowania, nie licząc akapitu podsumowującego, to kilka zdań z trzema odnośnikami literaturowymi. Znając ogrom prac, które zostały zrealizowane w Instytucie z obszaru mikroprzepływów oraz mając świadomość jak wiele one wniosły w rozwój np. technik kroplowych nie tylko w Polsce, ale i na świecie, łącznie z końcowymi etapami prac naukowych, jakimi przecież są wdrożenia, muszę przyznać, że tym fragmentem pracy Pana Kowalskiego jestem trochę rozczarowany. Rozumiem, że techniki

mikroprzepływowe są w jego przypadku tylko narzędziem w rozwiązaniu problemu badawczego, ale pisząc ten fragment nieco szerzej można było po prostu się pochwalić osiągnięciami macierzystej Jednostki, tym bardziej że praktycznie wszystkie elementy wykorzystywanego w pracy mikrosystemu były opracowane i zoptymalizowane w grupie prof. Garsteckiego

Dalsza część pracy, ku mojemu zaskoczeniu, to **Rozdział 2** zatytułowany „*Materials and Methods*”. Piszę, że byłem zaskoczony, ponieważ zabrakło mi w części teoretycznej pracy Pana Kowalskiego kilku istotnych elementów:

1. choćby krótkiej analizy/podrozdziału typu „state of art” stanu wiedzy na temat badań kinetyk reakcji hybrydyzacji w środowiskach wodnych.... czy tego typu reakcje były wcześniej badane?, czy badany był wpływ zatłoczenia molekularnego?, czy do tego typu badań wykorzystywano już wcześniej techniki mikroprzepływowe? Jeśli tak, to jakiego typu były to mikrosystemy?
2. krótkiego podsumowania analizy literaturowej, z którego jasno powinien wynikać cel lub cele badawcze, których realizacja pozwoliłaby zweryfikować sformułowane w rozprawie hipotezy badawcze - tych niestety też w pracy nie znalazłem.

W związku z powyższym poprosiłbym Doktoranta o uzupełnienie tych informacji i przedstawienie ich w trakcie prezentacji na publicznej obronie pracy doktorskiej.

W **Rozdziale 2** mgr Adam Kowalski zawarł spis najważniejszych odczynników z podziałem na oligonukleotydy, katalizatory i odczynniki odpowiedzialne za wywołanie efektu zatłoczenia molekularnego, krótko opisał układ pomiarowy oraz przedstawił (niestety bez nawet uproszczonego schematu) sposób wykonania elementów mikroprzepływowego systemu pomiarowego. Schemat taki szczególnie przydatny byłby w przypadku procedury wykonania prostego elementu detekcyjnego (DU) ponieważ nie wiem dlaczego, element z PDMS z mikrokanalem wykonany był techniką „podwójnego odlewu” (*ang. double casting method*). Poproszę również o wyjaśnienie, dlaczego forma poliwęglanowa wykorzystana do wykonania elementu P1 określona jest przez Doktoranta jako „maska”?

Rozdział 3, podzielony na 3 podrozdziały, Autor poświęca przedstawieniu swoich wyników badań oraz ich dyskusji. Pierwsza część poświęcona jest badaniom kinetyki asocjacji oligonukleotydów DNA w roztworach wodnych, roztworach o różnej sile jonowej (różne stężenia buforu fosforanowego) oraz katalizatorów (peptydu złożonego z 9 cząsteczek argininy i jonowych związków powierzchniowo czynnych CTAC, CPC, BTC, SDS i Brij L23). O ile zwiększenie siły jonowej powodowało niewielki wzrost stałej szybkości asocjacji, to zastosowanie kationowych związków powierzchniowo czynnych powodowało wzrost stałej szybkości prawie o 3 rzędy nawet gdy przekroczone jest CMC. Efekt ten Doktorant przypisał bardzo silnym oddziaływaniom dodatnio naładowanych fragmentów surfaktantów z ujemnie naładowanymi resztami fosforanowymi w niciach DNA. Zwiększenia stałej szybkości asocjacji nie zaobserwowano ani w przypadku

zastosowania surfaktantu niejonowego (BrijL23) oraz środka anionowego – SDS. Ta część pracy uzupełniona jest modelowaniem matematycznym, w którym model teoretyczny uwzględniał rozkład ładunku w cząsteczkach katalizatorów. Stosując opracowany model można dość precyzyjnie regulować szybkość reakcji hybrydyzacji DNA w szerokim zakresie poprzez modyfikację właściwości stosowanego katalizatora, co może mieć duże znaczenie we wszystkich obszarach, gdzie te reakcje są wykorzystywane. W kolejnym etapie badań Doktorant sprawdził jaki wpływ na hybrydyzację DNA w warunkach równowagowych mają zarówno różne stężenia kationów sodowych i potasowych oraz związków odpowiedzialnych za uzyskanie efektu zatłoczenia molekularnego. W przypadku kationów sodowych i potasowych efekt ich wpływu na stałą równowagi był niemonotoniczny, co także zaobserwowano dla „związków zatłaczających”. Przy wysokich stężeniach kationów może wystąpić nadmierna neutralizacja szkieletu fosforanowego DNA, co w konsekwencji zaburza równowagę elektrostatyczną wymaganą do stabilnego tworzenia podwójnej nici. Związki generujące efekt zatłoczenia molekularnego wpływają na kinetykę łączenia nici DNA, spowalniając reakcje hybrydyzacji. Doktorant w badaniach wykorzystał niewielki pod względem masy molowej glikol etylenowy (EG) i glikole polietylenowe o masach od 200 do 35 000 Da wszystkie o stężeniach do 50% wag., przy czym czas połowiczny tworzenia podwójnej nici DNA wynosił około 2 godziny dla EG i 4 godziny dla PEG 35k. Stałą równowagi (K) i zmianę energii swobodnej Gibbsa (ΔG) określano dla różnych stężeń glikoli, przy stałym stężeniu DNA i zaobserwowano wyraźne dwa efekty: małe cząsteczki zatłaczające (EG, PEG 200) obniżały K nawet o 3 rzędy wielkości, a ΔG wzrosła o +14,9 kJ/mol. Zaobserwowana destabilizacja wynika z interakcji EG z DNA, które zakłócają solwatację i tworzenie par zasad. Cząsteczki o dużej masie molowej powyżej 600 Da generowały efekt niemonotoniczny - K początkowo rosła (maksimum przy 5–20% wag.), a następnie jej wartość malała przy wyższych stężeniach PEG. ΔG również była niemonotoniczna. Początkowa stabilizacja tworzenia podwójnej nici DNA wynika z efektu wyczerpania (depletion), natomiast przy dużych stężeniach nadmiar cząsteczek zatłaczających destabilizuje podwójną nić DNA. Tu również Autor zaproponował stworzenie modelu matematycznego w którym równanie kwadratowe odzwierciedla początkowy wzrost K przy niskich stężeniach czynnika zatłaczającego (efekt stabilizujący) i jej spadek przy wysokich stężeniach (efekt destabilizujący). Współczynniki w równaniu odpowiadają odpowiednio za stabilizację wynikającą z sił wyczerpania oraz destabilizację spowodowaną wzrostem lepkości, ograniczeniem dyfuzji, zaburzeniami ekranowania elektrostatycznego i zmianami powłoki hydratacyjnej DNA. Współczynniki dopasowania w modelu zależą od masy cząsteczkowej czynnika.

Ostatnia część eksperymentów przedstawionych przez Doktoranta dotyczyła zastosowania modułowego systemu mikroprzepływowego opartego o mikrofluidykę kroplową. System ten składał się z modułu generującego krople DODU i modułu detekcyjnego DU. Takie rozwiązanie pozwala na odłączanie modułu detekcyjnego i utrzymywanie kropli (inkubację) przez określony czas.

W module DODU zastosowano bardzo ciekawe rozwiązania konstrukcyjne tzw. pułapek pozwalających uzyskać krople o odpowiednich rozmiarach, łączyć krople ze sobą wg zaprojektowanych protokołów i w konsekwencji uzyskiwać kolejne zdefiniowane rozcieńczenia badanej mieszaniny reakcyjnej – moim zdaniem jest to znakomite zobrazowanie zalet platform mikroprzepływowych. Zaproponowanie wykorzystania mikrosystemów kroplowych do badania stałych równowag reakcji hybrydyzacji DNA przez mgr. Kowalskiego niesie za sobą szereg korzyści – ograniczenie czasu analizy, kompatybilność z technikami analitycznymi MBA/FRET i FCS, oszczędność materiałów i wykorzystywanych odczynników, automatyzację etapów procedury analityczne eliminującej udział badacza w kolejnych etapach procedury eksperymentalne. Znając konstrukcje mikrosystemów kroplowych opracowywanych w IChF jestem przekonany o jakości danych uzyskiwanych przy ich wykorzystaniu.

Część eksperymentalna pracy Pana Kowalskiego zawiera bardzo bogaty materiał eksperymentalny, który Doktorant w sposób trochę zbyt syntetyczny jednak dobrze opisał (ok. 30 stron razem ze rysunkami). Elementy graficzne (wykresy, schematy) są w większości czytelne, ale w przypadku niektórych (np. rysunki 3.10 – kolory punktów, i 3.11 – czcionki i opisy osi i legendy) emocjonalny związek Autora z zagadnieniami miniaturyzacji wziął jednak górę – rozumiem to, ponieważ szanuję tradycje Instytutu i sam pracuję z mikrosystemami, niemniej jednak staram się przygotowywać wykresy raczej w skali makro niż mikro. Mam nadzieję, że na prezentacji ich czytelność będzie lepsza niż w ocenianej rozprawie. Ponadto, dodanie drugiego członu „Discussion” do tytułu tej części pracy jest moim zdaniem trochę na wyrost, ponieważ dyskusji uzyskanych wyników w odniesieniu do badań np. innych zespołów praktycznie w pracy nie ma. Jej brak znacznie utrudnia recenzentowi ocenę na ile wyniki zawarte w Rozdziale 3 charakteryzują się **nowością naukową, której uwypuklenie jest konieczne do uzyskania stopnia doktora**. Autor nie porównuje ilościowych danych otrzymanych w trakcie badań parametrów reakcji hybrydyzacji wywołanych np. przez czynniki zatłaczające z wartościami uzyskanymi przez innych badaczy, nie znalazłem również informacji czy próby zastosowania mikrosystemów do badań parametrów reakcji hybrydyzacji DNA były podjęte w innych ośrodkach, a jeśli tak to z jakim skutkiem? Jak na tle tych prac prezentują się wyniki uzyskane przez Doktoranta? Czy jakiś zespół badawczy próbował także modelować efekty badane w tej pracy lub podobne? Dobry opis przeprowadzonych eksperymentów, które wsparte są elementami modelowania matematycznego, **co jest dużą zaletą tej pracy**, przypomina raczej raport ze zrealizowanego projektu niż dyskusję uzyskanych wyników, której można oczekiwać od „prawie Doktora” na tym etapie rozwoju naukowego. Liczę, że w czasie publicznej obrony elementy takiej dyskusji pojawią się w prezentacji Doktoranta, w której podkreśli również aspekty nowości naukowej swoich badań i po prostu się nimi pochwali.

Pracę kończy 2 stronicowe podsumowanie, w którym Pan Kowalski przedstawił najważniejsze etapy swojej pracy oraz pokazał możliwości wykorzystania udoskonalonych strategii i procedur opartych o wykorzystanie mikrofluidyki kroplowej - zautomatyzowanej platformy mikroprzepływowej do prowadzenia bardziej wiarygodnych badań kinetyk reakcji hybrydyzacji DNA. Poprzez zastosowanie opracowanych modeli możliwe będzie, zdaniem Autora, przewidywanie zachowania kwasów nukleinowych w odpowiednich środowiskach, co może skutkować np. rozwojem bardziej wydajnych technik diagnostycznych wykorzystujących hybrydyzację nici DNA.

Cała praca, mimo niewielkiej objętości, jest dobrze skomponowana jako całość, mimo braku podsumowania części literaturowej oraz sformułowanych hipotez badawczych. Podczas jej lektury czytelnik jest przekonany, że opisane w niej badania były zaplanowane chronologicznie i w bardzo przemyślany sposób, co jest **bardzo mocną stroną recenzowanej pracy doktorskiej**.

Podsumowując stwierdzam, przedłożona do recenzji rozprawa doktorska autorstwa Pana mgr. inż. Adama Krzysztofa Kowalskiego odpowiada warunkom określonym, w art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. – Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2024 poz. 1571 z późn. zm.), i wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie Pana mgr. Adama Krzysztofa Kowalskiego do dalszych etapów postępowania o nadanie stopnia doktora.