

Warszawa, 17.08.2026

dr hab. Anna Niedźwiecka, prof. IF PAN
Środowiskowe Laboratorium Fizyki Biologicznej
Instytut Fizyki Polskiej Akademii Nauk

**Recenzja pracy doktorskiej mgr inż. Karoliny Kucharskiej
zatytułowanej „Complex formation of small ligands with nucleic acids”**

Rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Kucharskiej została przygotowana w Instytucie Chemii Fizycznej PAN. Promotorem pracy jest prof. dr hab. Robert Hołyst, a promotorem pomocniczym dr Tomasz Kalwarczyk. Zagadnienia dotyczące oddziaływań między komponentami wewnątrzkomórkowymi oraz ich interakcji z lekami, a także rozwijanie metod ich ilościowego pomiaru, od lat stanowią z powodzeniem przedmiot badań grupy prof. R. Hołysta. Praca doktorska mgr inż. Karoliny Kucharskiej stanowi ich owocne rozwinięcie.

Ocena formalna

Wyniki osiągnięte przez Doktorantkę zostały już częściowo opublikowane w czterech czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym. Wyniki opisane w trzech z nich stanowią podstawę ocenianej rozprawy. W jednym przypadku p. mgr inż. Karolina Kucharska jest pierwszą autorką, w innym drugą, a w trzecim znajduje się na dalszym miejscu.

Rozprawa jest napisana w formie tradycyjnej, zrozumiałą angielszczyzną. Poza kilkoma błędami językowymi, które wymieniam z obowiązku pod koniec recenzji, język jest poprawny gramatycznie, stylistycznie i interpunkcyjnie. Zgodnie z obecną konwencją w postępowaniach awansowych, w rozprawie zastosowano często pierwszą osobę liczby pojedynczej, aby odróżnić wkład własny od wyników innych osób, co bardzo ułatwia ocenę. Autorka zamieściła przydatne listy skrótów, rysunków i tabel. Rozprawa ma układ typowy dla współczesnych publikacji naukowych i zawiera: *Introduction*, *Materials and methods*, *Results and discussion*, podsumowanie zatytułowane *Main results, conclusions and future prospects*, oraz *Bibliography* (obejmującą ok. czterysta odnośników). Praca liczy sto dziewięćdziesiąt cztery strony, jest opatrzona *Spisem treści* oraz *Streszczeniem* w języku polskim i angielskim. *Introduction* obejmuje bardzo obszerny i pogłębiony przegląd informacji literaturowych, z podkreśleniem biochemicznego zrozumienia badanych procesów, aspektów terapeutycznych badanych układów oraz pułapek metodologicznych.

W kwestii praw autorskich - podczas obrony chciałabym się upewnić, że Autorka posiada zgodę (np. ze strony internetowej wydawców) na reprodukcję w rozprawie rysunków skopiowanych z artykułów naukowych lub że rysunki te są dostępne na licencji Creative Commons (wtedy wystarczy cytowanie). Przykładowo, Fig. 16. i 17. są skopiowanymi fragmentami lub rysunkami z zacytowanych artykułów.

Zasadniczą wątpliwość formalną budzi to, że w rozprawie nie ma pod/rozdziału „Aim of the work”, „Objectives”, „Goal of the work” itp. Cele rozprawy są rozproszone po tekście.

Najbliżej formalnego sformułowania celu jest początek *Results and discussion* (str. 96): „In this thesis, I focus on the kinetic analysis of several key reactions”, „My research focused on studying the interactions between intercalators and nucleic acids ... to determine their consecutive equilibrium constants.” Dochodzą tu kolejne elementy: powtórzenie badań wiązania antracyklin w 36 °C oraz badanie celów molekularnych YO-PRO-1 i oddziaływania z tRNA. W Abstrakcie można odtworzyć cztery faktyczne obszary pracy: (1) wyznaczenie stałych równowagowych wiązania barwników cyjaninowych (2) oraz antracyklin, (3) fotowysbielenie YO-PRO-1 związanego z immobilizowanym DNA, (4) identyfikacja targetów YO-PRO-1. Dalej pojawiają się już tylko cele poszczególnych eksperymentów, np. „The goal ... was to study the mechanisms of the reactions” (str. 98), „the ultimate goal was to characterise the reactions quantitatively by determining equilibrium constants.” (str. 119). Jest też miejsce, gdzie jest testowana hipoteza, lecz słowo to odnosi się tutaj bezpośrednio do eksperymentu, a nie do nadrzędnej hipotezy rozprawy (str. 104; “To confirm the hypothesis that YO-PRO-1 dye follows a single, mono-intercalation mechanism, and that YOYO-1 dye intercalates in two separate modes of interactions...”); fragment ten pojawia się dopiero w *Results and discussion*. Ponadto dla YOYO-1 trudno mówić o pytaniu badawczym, skoro w *Introduction* Autorka opisuje bis-interkalację jako znaną. Jest też fragment przypominający hipotezę w części o targetach komórkowych YO-PRO-1 (str. 149). Obserwacja intensywnego barwienia jąderka prowadzi Autorkę do przypuszczenia, że rybosomy lub ich podjednostki mogą być celem YO-PRO-1. Można zrekonstruować jeszcze jedną hipotezę, że temperatura wpływa na stałe równowagi, ale Autorka nie formułuje jej *explicitie*.

Jest to realny mankament kompozycji rozprawy. W doktoracie obejmującym kilka dość luźno połączonych bloków eksperymentalnych brak jasno zdefiniowanego celu głównego i/lub celów szczegółowych utrudnia ocenę, w jakim stopniu rozprawa realizuje pierwotnie postawione zamierzenia badawcze - co praca miała zweryfikować, a co było eksploracyjnym pomiarem powiększającym zbiór danych.

Mimo powyższych uwag stronę formalną rozprawy doktorskiej mgr inż. Karoliny Kucharskiej można zaakceptować.

Ocena merytoryczna

Mocne merytoryczne i metodologiczne strony rozprawy

Do najważniejszych zalet rozprawy należy przede wszystkim ogromny zakres wykonanej zaawansowanej pracy eksperymentalnej oraz jej elegancki naukowo, systematyczny, ilościowy charakter. Przedstawione badania obejmują kilka powiązanych ze sobą zagadnień dotyczących oddziaływań małych cząsteczek z kwasami nukleinowymi: precyzyjne wyznaczanie stałych równowagi kompleksowania barwników cyjaninowych i antracyklin z DNA, analizę mechanizmu molekularnego wiązania YOYO-1, ilościowe badanie oddziaływania YO-PRO-1 z tRNA, a także eksperymenty ciągłego fotowysbielenia z immobilizowanym λ-DNA oraz poszukiwanie biologicznych celów YO-PRO-1. Co istotne, nie są to pojedyncze obserwacje o charakterze jakościowym, lecz rozbudowane serie pomiarowe, z wnikliwą analizą i wyrugowaniem artefaktów aparaturowych, prowadzące do

wyznaczenia parametrów fizykochemicznych badanych układów. Sama struktura rozprawy pokazuje szeroki zakres części eksperymentalnej.

Na szczególne podkreślenie zasługuje zaawansowanie zastosowanego warsztatu eksperymentalnego. Głównym narzędziem badawczym jest spektroskopia korelacji fluorescencji (FCS), wykorzystana w połączeniu z analizą jasności molekularnej, pomiarami przy różnych polaryzacjach światła oraz eksperymentami ciągłego fotowysbielenia dla próbki unieruchomionej w żelu. Są to techniki wymagające bardzo dobrego rozumienia i kontroli aparatury, warunków pomiarowych oraz fotofizyki stosowanych fluoroforów. Autorka prowadzi pomiary w zakresie stężeń nanomolarnych, a więc w reżimie, w którym niewielkie odchylenia parametrów optycznych, niedokładność kalibracji czy niekontrolowane fotowysbielenie mogą w istotny sposób wpływać na wynik końcowy. Z tego punktu widzenia bardzo mocną stroną pracy jest poprzedzanie właściwych eksperymentów wyczerpującymi seriami kontrolnymi warunków wzbudzenia, np. dla barwników cyjaninowych Autorka eksperymentalnie wyznaczyła zakres mocy lasera, w którym sygnał pozostawał liniowo zależny od mocy wzbudzenia i nie obserwowano jeszcze istotnego fotowysbielenia, przyjmując następnie 30 μW dla YO-PRO-1 i 50 μW dla YOYO-1.

Bardzo dobrą stroną metodologiczną jest również sposób kalibracji układu FCS, którą prowadzono z wykorzystaniem rodaminy 110 o znanym współczynniku dyfuzji, w temperaturach 25 °C i 36 °C. Autorka wykonała 24 indywidualne pomiary kalibracyjne, a następnie analizowała funkcje autokorelacji przy użyciu modelu uwzględniającego dyfuzję oraz stan trypletowy. Na tej podstawie wyznaczała rozmiar i efektywną objętość ogniska konfokalnego. Ważnym elementem świadczącym o samodzielności warsztatowej Doktorantki jest fakt, że dane eksportowane z aparatury były analizowane przy użyciu samodzielnie napisanych skryptów w języku Python, z zastosowaniem nieliniowego dopasowania metodą najmniejszych kwadratów. Takie podejście wymaga nie tylko sprawności eksperymentalnej, lecz również rozumienia modeli fizycznych opisujących pomiary i umiejętności ich implementacji numerycznej.

Za bardzo istotną wartość rozprawy uważam zastosowanie opracowanej w grupie prof. Roberta Hołysta metody analizy jasności "Brightness Analysis Method (BAM)" do ilościowego opisu tworzenia kompleksów, która wykorzystuje zmianę jasności molekularnej fluoroforu po utworzeniu kompleksu interkalacyjnego i pozwala wyznaczać stałe równowagi w zakresie bardzo niskich stężeń. W rozprawie nie ograniczono się do porównania całkowitych intensywności fluorescencji, lecz dla kolejnych eksperymentów obliczano jasności molekularne wolnych ligandów i kompleksów, a następnie wykorzystywano je do dopasowania odpowiednich modeli równowagowych. W przypadku YOYO-1 analiza uwzględniała dwa etapy oddziaływania z DNA, odpowiadające formom mono- i bis-interkalowanym, i doprowadziła do wyznaczenia parametrów opisujących kolejne stany. Stanowi to bardziej adekwatny sposób opisu badanego układu kwas nukleinowy:ligand niż traktowanie wiązania barwnika z DNA jako pojedynczego procesu równowagowego.

Mocną stroną rozprawy jest ponadto ogromna ilość przedstawionych danych pierwotnych i powtórzeń eksperymentalnych. Wyniki nie zostały sprowadzone wyłącznie do

kilku wykresów reprezentatywnych i końcowych wartości. W pracy zamieszczono dane z kolejnych serii miareczkowania, wartości intensywności, jasności molekularnej, wyniki kolejnych dopasowań oraz zestawienia wartości średnich. Dotyczy to zarówno doświadczeń z YO-PRO-1 i YOYO-1, jak i antracyklin oraz eksperymentów polaryzacyjnych i fotowysbielenia. Taki sposób prezentacji umożliwia ocenę rzeczywistego rozrzutu danych i powtarzalności eksperymentów. Jest to szczególnie istotne w przypadku metod opartych na pomiarach fluorescencyjnych na poziomie pojedynczych molekuł, dla których zmienność pomiędzy seriami pomiarowymi jest ważną częścią informacji eksperymentalnej. Widać w tym ogromny nakład pracy Doktorantki.

Za najbardziej oryginalną metodologicznie część rozprawy uważam eksperymenty z immobilizowanym λ -DNA kompleksowanym przez YO-PRO-1, połączone z kontrolą polaryzacji światła wzbudającego i ciągłym wybieleniem fluorescencji. Autorka zastosowała to sprytnie połączenie metody FCS z obrazowaniem konfokalnym, aby wyznaczyć, jaka część fluoroforów znajdujących się fizycznie w obszarze wzbudzenia rzeczywiście wnosi wkład do obserwowanego sygnału, jeśli swoboda orientacji przestrzennej fluoroforu jest ograniczona w żelu. W tym celu połączono kalibrację objętości konfokalnej, pomiar jasności molekularnej kompleksu DNA–YO-PRO-1 w roztworze, oszacowanie teoretycznej liczby kompleksów znajdujących się w objętości obserwacji oraz eksperymenty wybielenia dla polaryzacji liniowej i kołowej, prowadzone w dwóch temperaturach. Wyniki tej części wskazują, że w zastosowanych warunkach efektywnemu fotowysbieleniu ulegało przeciętnie jedynie około połowy immobilizowanych kompleksów DNA–YO-PRO-1, podczas gdy pozostała frakcja nie wnosiła porównywalnego wkładu do obserwowanego zaniku fluorescencji. Co ważne, dla polaryzacji liniowej średni udział kompleksów, które uległy fotowysbieleniu wynosił około 60% zarówno przy 25 °C, jak i 36 °C, natomiast dla polaryzacji kołowej był niższy i wynosił około 50%. Sam pomysł eksperymentalnego oszacowania „widzialnej” frakcji fluoroforów w układzie immobilizowanym uważam za bardzo ciekawy i potencjalnie istotny dla ilościowej interpretacji doświadczeń fluorescencyjnych. Należy oczywiście zachować ostrożność w utożsamianiu frakcji, która nie została wybielona z fluoroforami niewzbudzanymi z powodu niekorzystnej orientacji momentu dipolowego. Na wynik mogą wpływać również inne czynniki fotofizyczne i eksperymentalne. Warto jednak podkreślić, że Autorka w części podsumowującej dopuszcza zarówno niekorzystną orientację, jak i niewystarczające wzbudzenie oraz wskazuje potrzebę dalszych pomiarów polaryzacyjnych. Tym samym jest to ciekawy wynik metodologiczny.

Bardzo wartościowym elementem rozprawy jest także ilościowe wykazanie oddziaływania YO-PRO-1 z tRNA. Znaczenie tej części wykracza poza samo jakościowe stwierdzenie, że YO-PRO-1 może wiązać RNA. Dla konkretnego tRNA przeprowadzono pomiary pozwalające oszacować zarówno powinowactwo, jak i jasność molekularną kompleksu. Wyznaczona w rozprawie stała równowagowa dla oddziaływania YO-PRO-1 z tRNA w 36 °C jest rzędu 10^6 [M⁻¹], a więc tego samego rzędu co dla YO-PRO-1 z DNA w tej samej temperaturze. Jednocześnie kompleks z tRNA charakteryzuje się wyraźnie większą jasnością molekularną. Jest to rezultat interesujący zarówno z punktu widzenia fotofizyki barwnika, jak i jego potencjalnego wykorzystania jako sondy biologicznej.

Punktem wyjścia badań RNA była obserwacja podczas obrazowania komórek HeLa: mimo że YO-PRO-1 jest powszechnie traktowany jako barwnik oddziałujący z dwuniciowym DNA, zaobserwowano wyraźne barwienie cytoplazmy i jąderka, natomiast nie zaobserwowano charakterystycznego barwienia DNA jądrowego. Ta obserwacja została potraktowana jako punkt wyjścia do kolejnych eksperymentów, obejmujących lizaty komórkowe, próbki trawione RNazą, całkowitą pulę RNA oraz tRNA. Co pozytywne, rezultat niespełniający początkowego oczekiwania nie został potraktowany jako artefakt do pominięcia, lecz doprowadził do sformułowania nowej hipotezy i jej eksperymentalnego sprawdzenia. Jednocześnie Autorka jest świadoma ograniczeń metody, gdyż zauważa, że w przypadku złożonego lizatu komórkowego ze względu na obecność wielu składników fluorescencyjnych nie było możliwe wiarygodne dopasowanie funkcji autokorelacji.

Pozytywnie oceniam również systematyczne porównanie stałych równowagowych wiązania w 25 °C i 36 °C. Zastosowanie tego samego układu pomiarowego i analogicznej procedury daje możliwość oceny wpływu temperatury na parametry tworzenia kompleksów. Nawet jeżeli obserwowane różnice temperaturowe nie są duże i interpretacja wymaga ostrożności, samo eksperymentalne porównanie jest bardzo wartościowe.

Podsumowując, rozprawa prezentuje połączenie ogromnej systematycznej pracy eksperymentalnej z zaawansowanym warsztatem pomiarowym i ilościową analizą danych. Autorka wykazała zarówno umiejętność prowadzenia wymagających pomiarów, optymalizacji warunków, jak i analizy danych z wykorzystaniem własnych skryptów oraz stosowania modeli matematycznych do wyznaczania parametrów równowagowych. Rozprawa ma zarówno wartość poznawczą, jak i wnosi nowe komponenty metodologiczne.

Wątpliwości merytoryczne

1. Model drugiego etapu wiązania ligandów do kwasów nukleinowych (str. 91). Jest to najpoważniejszy problem merytoryczny w rozprawie. Autorka pisze, że drugi etap tworzenia kompleksu to przyłączenie kolejnego fragmentu lub kolejnej cząsteczki antracykliny do kompleksu DNA–L1, ale równanie na K_2 zapisuje jako: $NA + NA-L1 \rightleftharpoons NA-L2$, a więc w definicji K_2 po lewej stronie występuje wolny kwas nukleinowy (NA) zamiast wolnego ligandu. Taki zapis reakcji przyłączenia kolejnego L do kompleksu DNA–L1 jest błędny. Przypuszczam, że zapis ten został zasugerowany faktem, iż w eksperymencie do ligandu dodawano wzrastające stężenie NA. We wcześniejszej pracy tej samej grupy (Zhou Y. *et al.*, *Analyst*, 2020, 145, 6600–6606) model analogicznej reakcji na K_2 jest zapisany poprawnie, zgodnie z chemią procesu: $drug + drug-DNA \rightleftharpoons drug-(drug-DNA)$, gdzie K_2 zależy od stężenia wolnego ligandu i kompleksu z pierwszego etapu. Poprawnie, w rozprawie powinno być: $L1 + NA-L1 \rightleftharpoons NA-L2$.

Rodzi to konsekwencje dla dalszych przekształceń, aż do ostatecznego równania (20), użytego przez Autorkę do wyznaczenia stałych K_2 w procedurze dopasowania numerycznego. Jeśli w kodzie wyliczającym K_2 użyto rzeczywiście równania (20) w takiej formie, jak w rozprawie, to wartości K_2 dla antracyklin okazałyby się błędne. Być może jest to wyłącznie błąd zapisu w tekście rozprawy - trzeba sprawdzić, jakie faktycznie równanie zostało zastosowane w kodzie. Procedura wymaga również sprawdzenia dla YOYO-1, ponieważ

drugi etap bis-interkalacji jest zmianą stanu tej samej cząsteczki YOYO-1, a nie reakcją z kolejną cząsteczką DNA. Skutki zastosowania tego modelu obejmują rozdziały rozprawy na str. 126–160. Podczas obrony prosiłabym o informację, na jakim etapie wkraśl się ten błąd, a jeśli wystąpił on w kodzie, to jak zmieniać się wartości K i wnioski po jego poprawieniu.

2. Przypisanie składnika „total RNA” do całych rybosomów jest moim zdaniem nieuprawnione (str. 86, 149–152, 165–168). Komercyjny preparat ThermoFisher nr 4307281, opisany jako oczyszczony Total RNA Control (Human), nie jest preparatem rybosomów lub ribonukleoprotein. Tymczasem komponent FCS o R_h ok. 24,5 nm zostaje przypisany „ribosomes, which contain rRNA and ribosomal proteins”, a następnie użyty jako wykazanie wiązania do rybosomów. Z samego rozmiaru nie można tego wnioskować. W oczyszczonym total RNA taki komponent może odpowiadać dużym RNA, agregatom lub heterogenicznym zespołom RNA itd. Nie stanowi to bezpośredniego dowodu na cały rybosom, ani na dużą podjednostkę rybosomalną (LSU). Wnioski o „cellular targets” są za mocne w stosunku do danych (str. 149–152, 165–167). Sama Autorka przyznaje, że do pomiarów FCS dla lizatu nie można wiarygodnie analizować numerycznie, bo występuje wiele obiektów fluorescencyjnych. Mimo tego dalej pojawiają się mocne stwierdzenia o tRNA, rRNA, rybosomach i LSU jako udowodnionych targetach komórkowych.

3. W *Abstrakcie* i na str. 152 znajduje się informacja, że Doktorantka wykonywała część *in vitro*, a dane *in vivo* należą do rozprawy innej osoby. Na str. 149 jednak przedstawiono obrazowanie HeLa jako własne “In this chapter, I present my investigation on YO-PRO-1 dye cellular targets.”, “I stained HeLa cells with YO-PRO-1 dye solution (Fig. 44). ... I observed staining of the cytoplasm volume, prominent staining of nucleoli, and the nuclear membrane. ... I did not observe nuclear DNA staining.” i z niego wyprowadzane są wnioski komórkowe. Wymaga to wyjaśnienia.

4. Stwierdzenie, że „YO-PRO-1 wiąże RNA” nie jest samo w sobie nowym odkryciem (str. 149–152 i 165–168). Już w latach 90-tych XX w. pokazano jednoczesne barwienie RNA przez YO-PRO-1, np. DOI: 10.1128/AEM.62.5.1649-1655.1996., DOI: 10.1021/la971318g. Zatem nowością jest ilościowa charakterystyka powinowactwa do tRNA.

5. W rozprawie pojawia się pewna rozbieżność dotycząca wpływu temperatury na stałą wiązania. Autorka na str. 120 stwierdza: “I observed a general decrease of approximately one order of magnitude for all the complexes formed at 36 °C, compared to the values measured at 25 °C.” i na str. 126, 155, 158, 159 konsekwentnie powtarza to stwierdzenie. Tymczasem z tabel nr 28, 29 i 30 (str. 120–121) wynika spadek wartości najczęściej o czynnik ~ 2 , a maksymalnie o czynnik ~ 5 i to tylko w jednym przypadku K_2 dla oddziaływania DNA z YOYO-1. Dla DNA i YO-PRO-1 jest to wręcz zadziwiająca zmiana w granicach błędu z $1,1 \pm 0,4$ na $0,75 \pm 0,2 \cdot 10^6$ [M⁻¹]. Wniosek nr 4 na str. 155: “4. ...For most investigated systems, an increase in temperature from (25 °C) to (36 °C) caused a decrease in equilibrium constants by approximately one order of magnitude.” jest więc ilościowo błędny. Nie jest to poważny błąd, lecz nadinterpretacja. Nie zmienia to oczywiście sugestii, że ruchy termiczne osłabiają tworzenie kompleksów.

6. Dwie różne wartości K dla oddziaływania YO-PRO-1 z DNA w 36 °C w tabeli 28 na str. 120 ($3,9 \pm 0,1 \cdot 10^5$ [M⁻¹]) i w tabeli 30 na str. 121 ($7,5 \pm 2,0 \cdot 10^5$ [M⁻¹]). Są to wyniki z dwóch sposobów analizy i są zgodne w granicy 3 sigma, ale rozprawa powinna jednoznacznie wskazywać, który jest wynikiem końcowym i dlaczego.

7. Jest też rozbieżność dla tRNA i YO-PRO-1 w 36 °C ($7,5 \pm 0,4 \cdot 10^5$ [M⁻¹]; tabele nr 28 i 30) względem wartości K podanej w publikacji związanej z rozprawą *Nanoscale Horiz.*, 2025, 10, 388–400, str. 393, gdzie podano $3,01 \pm 1,43 \cdot 10^5$ [M⁻¹]. W rozprawie zaznaczono przy tRNA, że fit liczony jest względem stężenia cząsteczek, a w publikacji względem stężenia miejsc wiążących zakładając 5 par zasad na jedną cząsteczkę YO-PRO-1. Prosiłabym o wyjaśnienie, czy chodzi tylko o inną normalizację liczby miejsc wiążących - obecnie czytelnik dostaje dwie różne stałe dla tego samego układu.

8. Część antracyklinowa jest w dużej mierze rozszerzeniem wcześniejszej pracy, a nie nowym mechanizmem (str. 111, 126–160). Doktorantka pisze, że powtarza w temperaturze 36 °C eksperymenty wykonane wcześniej w grupie prof. Roberta Hołysta w 25 °C. W publikacji Zhou *et al.* 2020 r. zastosowano jasność pojedynczej cząsteczki do tych samych czterech antracyklin i opisano dwa etapy wiązania. Wartości w 25 °C używane do wnioskowania o wpływie temperatury pochodzą z tej wcześniejszej publikacji.

9. Dwustopniowe wiązanie YOYO-1 nie powinno być przedstawiane jako nowa obserwacja (str. 154–156). We wstępie (str. 33) Autorka opisuje mono- i bis-interkalację jako znane. Wcześniejsze niezależne badania pokazywały więcej niż jeden stabilny stan wiązania YOYO-1, więc oryginalność wyników Autorki leży raczej w ilościowym wyznaczeniu parametrów oddziaływania metodą analizy jasności, a nie w samym odkryciu dwóch stanów.

10. Równanie FCS dla trypletu na str. 87 wygląda na błędnie zapisane. Zamiast $T/(1+T)$ powinno być $T/(1-T)$. Proszę o wyjaśnienie, czy tylko wzór w tekście rozprawy jest błędny, czy też taki był zapis w kodzie i tak dopasowywano wyniki, co wpływałoby na kalibrację N , jasność itd. W jakim zakresie zmieniłyby się poprawne wyniki, jeśli fitowano niepoprawny wzór?

11. Na str. 119 występuje nietypowa interpretacja jasności cząsteczkowej wolnego barwnika YO-PRO-1 lub YOYO-1 jako rozpraszania światła. Autorka pisze, że α wolnego barwnika „comes from scattering of the laser on the dye's molecules” i interpretuje zmianę temperaturową jako zmianę rozpraszania, podczas gdy powinniśmy raczej mówić o emisji.

12. Na str. 96 zdanie „Equilibrium constants should be the essential parameter for cardiotoxicity” wydaje się zbyt daleko idącym biologicznym uproszczeniem, gdyż kardiotoksyczność antracyklin jest wieloczynnikowa.

13. W rozprawie występuje nielogiczna pętla: w *Introduction* Autorka powołuje się na własną publikację (str. 33, [138]) pisząc o znanych własnościach bis-interkalacyjnych YOYO-1, podczas gdy później ta właśnie publikacja jest podstawą rozdziału *Results and discussion*. Wstęp do rozprawy doktorskiej powinien opisywać stan wiedzy przed podjęciem badań i na tej podstawie definiować problem badawczy. Jest to kolejny przejaw problemu związanego z brakiem rozdziału definiującego cel pracy.

14. Z obowiązku recenzenckiego zwracam też uwagę na drobne błędy językowe:

- powtarzający się błąd zmieniający sens: “marks for the incorrectly prepared sample that did not result in a non-physical value...”, co znaczy, że próbka nie dała niepoprawnej wartości, więc odwrotnie do zamierzenia Autorki. Powinno być np.: “indicates an incorrectly prepared sample that yielded a non-physical value.” Ta konstrukcja występuje w wielu tabelach.
- nie wiadomo, o co chodzi z czarnymi kropkami, które są opisane jako „co dziesiąty pomiar” na rys. 45 i 46, podczas zaznaczono na czarno pomiar co trzeci lub co czwarty.
- można też znaleźć powtarzające się niezręczności, np. niekonsekwentnie stosowane czasy i polski szyk zdania przeniesiony do angielskiego.

Podsumowując, rozprawę oceniam jako wartościową. Uwagi krytyczne nie umniejszają jakości merytorycznej zaprezentowanych wyników. Mam nadzieję, że będą one stanowić punkt wyjścia do ciekawej dyskusji podczas obrony.

Rozprawa prezentuje ogólną wiedzę teoretyczną Doktorantki w dyscyplinie chemia oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej, ponieważ zaprezentowane spektrum zagadnień i zaawansowany warsztat eksperymentalny w zakresie biochemii i chemii fizycznej są bardzo szerokie. Oryginalność wyników rozprawy opiera się na kilku elementach, m.in. na ilościowej analizie oddziaływania YO-PRO-1 z tRNA oraz na oryginalnym rozwiązaniu problemu metodologicznego związanego z pytaniem, jaka część immobilizowanych fluoroforów YO-PRO-1 z DNA daje efektywny sygnał w zależności od geometrii i polaryzacji wzbudzenia.

Rozprawa doktorska spełnia warunki określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2021 r. poz. 478 z późn. zm.) oraz kryteria zwyczajowe. Wnoszę do Rady Naukowej Instytutu Chemii Fizycznej PAN o dopuszczenie mgr inż. Karoliny Kucharskiej do dalszych etapów przewodu doktorskiego.



Anna Niedźwiecka