UNIWERSYTET IM. ADAMA MICKIEWICZA W POZNANIU
Centrum NanoBioMedyczne
Zastępca Dyrektora

Poznań, 28.07.2026

Recenzja

rozprawy doktorskiej
Pani **mgr inż. Karoliny Kucharskiej**
pt. ***Complex formation of small ligands with nucleic acids***
zrealizowanej pod opieką
prof. dr hab. Roberta Hołysta oraz dr Tomasza Kalwarczyka
w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk w Warszawie

1. Ocena trafności tematu i celu rozprawy

Rozprawa doktorska Pani mgr inż. Karoliny Kucharskiej została przygotowana w ramach Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych w Instytucie Chemii Fizycznej Polskiej Akademii Nauk. Wyniki badań zaprezentowane w niniejszej rozprawie zostały współfinansowane z projektu NCN: OPUS pt. *Changes of intracellular transport during cell death.*

Doktorantka jest współautorką czterech publikacji naukowych opublikowanych w uznanych czasopismach o zasięgu międzynarodowym. Trzy z nich zostały wskazane, jako powiązane z rozprawą doktorską, a w jednej z nich doktorantka jest wskazana jako pierwszy autor.

Rozprawa doktorska poświęcona jest badaniom dwóch grup związków o właściwościach fluorescencyjnych: barwników cyjaninowych oraz antracyklin, z uwzględnieniem podstaw ich oddziaływań z kwasami nukleinowymi oraz analizie mechanizmów tych oddziaływań na poziomie molekularnym. Jako model biologiczny doktorantka wykorzystała komórki nowotworowe linii HeLa. Tematyka ta wpisuje się w aktualne trendy badawcze w dyscyplinie nauki chemiczne, a jednocześnie ma istotne znaczenie dla badań biomedycznych, w szczególności nad molekularnymi podstawami działania leków cytostatycznych oraz rozwojem nowoczesnych metod diagnostyki i terapii nowotworów.

Barwniki cyjaninowe należą do grupy najważniejszych fluoroforów wykorzystywanych w biologii molekularnej i diagnostyce medycznej, natomiast antracykliny stanowią jedną z najlepiej poznanych i najczęściej stosowanych klas leków chemioterapeutycznych, których aktywność przeciwnowotworowa jest już znana od początku lat 60. XX wieku. W kontekście badań nad nowotworami szczególnie istotne jest zrozumienie mechanizmów oddziaływania

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl

antracyklin z DNA, obejmujących interkalację, oddziaływania typu π-π oraz wpływ na aktywność topoizomerazy II. Wykorzystanie tych związków, oprócz obrazowania, umożliwia monitorowanie transportu i akumulacji leków w komórkach nowotworowych oraz ocenę zmian molekularnych zachodzących podczas terapii. Z perspektywy nauk chemicznych interesująca jest analiza zmian właściwości fluorescencyjnych zachodzących po związaniu badanych związków z kwasami nukleinowymi, ponieważ dostarcza informacji o strukturze i dynamice powstających kompleksów.

Temat rozprawy jest aktualny, naukowo uzasadniony i osadzony w światowej literaturze przedmiotu. Doktorantka przeprowadziła ciekawą dyskusję, a wyniki zaprezentowane w rozprawie zostały w większości opublikowane w prestiżowych czasopismach. Uzyskana wiedza ma istotną wartość poznawczą i stanowi podstawę opracowywania nowych sond fluorescencyjnych i związków terapeutycznych o zwiększonej selektywności wobec komórek nowotworowych.

2. Ocena merytoryczna rozprawy

Rozprawa doktorska poświęcona jest badaniom oddziaływań wybranych ligandów z kwasami nukleinowymi z zastosowaniem zaawansowanych metod mikroskopowych i spektroskopowych opartych na fluorescencji, w tym spektroskopii korelacji fluorescencji (FCS), analizy jasności molekularnej (BAM), analizy fotowybielania (CFP), mikroskopii konfokalnej oraz czasu życia fluorescencji (FLIM).

Autorka przedstawiła bardzo obszerny wstęp teoretyczny (84 strony) obejmujący budowę i właściwości DNA, RNA, charakterystykę związków cyjaninowych i antracyklin, a także podstawy stosowanych metod eksperymentalnych. Część literaturowa jest aktualna, oparta na licznych doniesieniach literaturowych i stanowi wprowadzenie do problematyki badań.

Największą wartością rozprawy jest część eksperymentalna oraz dyskusja uzyskanych wyników. Autorka wykazała się umiejętnością twórczego wykorzystania metod spektroskopowych do ilościowego opisu procesów kompleksowania ligandów z kwasami nukleinowymi. Cenne jest także zastosowanie analizy jasności molekularnej do wyznaczania stałych równowagi w warunkach odpowiadających stężeniom spotykanym w komórkach. Podejście to stanowi interesujące rozwinięcie klasycznych metod oznaczania parametrów oddziaływań biomolekularnych.

Do najważniejszych osiągnięć rozprawy należy zaliczyć: i) ilościowe wyznaczenie stałych równowagi kompleksowania YO-PRO-1 i YOYO-1 z DNA, ii) analizę mechanizmu jedno- i dwuetapowej interkalacji YOYO-1, iii) wyznaczenie frakcji niewzbudzanych kompleksów

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl

DNA-YO-PRO-1 wynikającej z orientacji momentów dipolowych z wykorzystaniem metody CFP, a także iv) identyfikację celów molekularnych YO-PRO-1 wśród kwasów nukleinowych.

Wszystkie eksperymenty są logicznie zaprojektowane a wyniki opracowane w staranny sposób. Istotną część pracy stanowi analiza ilościowa obejmująca dopasowanie funkcji autokorelacji FCS, zastosowanie modeli jedno- i dwuskładnikowej dyfuzji, modeli jedno- i dwuetapowego tworzenia kompleksów, wyznaczanie stałych równowagi i jasności molekularnej oraz analizę mechanizmów kompleksowania barwników i antracyklin z kwasami nukleinowymi. Pozwoliło to na wiarygodne wyznaczenie parametrów opisujących oddziaływania badanych ligandów z kwasami nukleinowymi oraz rozbudowaną interpretację mechanizmów tworzenia się kompleksów.

Praca ma uporządkowaną strukturę. Konstrukcja rozprawy nie budzi zastrzeżeń, jednak warto zwrócić uwagę, że Autorka nie sformułowała w sposób jednoznaczny celu głównego pracy ani celów szczegółowych w postaci odrębnego podrozdziału czy podpunktu. Cele badań można odtworzyć na podstawie abstraktu i opisu części eksperymentalnej, jednak nie zostały one wyraźnie wyodrębnione. Ponadto brakuje wyraźnie postawionej hipotezy badawczej na początku rozprawy. Na stronie 104 znaleźć można jedynie hipotezę cząstkową dotycząca mechanizmu interkalacji barwników YO-PRO-1 i YOYO-1:

"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..."

Uważam, że jednoznaczne sformułowanie celu, celów szczegółowych oraz hipotezy badawczej na początku rozprawy zwiększyłoby jej przejrzystość metodologiczną i ułatwiło ocenę stopnia realizacji założonych zamierzeń badawczych.

3. Strona formalna i językowa

Praca została napisana w języku angielskim, ma przejrzystą strukturę i logiczny układ. Składa się z pięciu głównych rozdziałów, obejmujących: wstęp literaturowy, metodykę badawczą, dyskusję wyników, wnioski końcowe i obszerną bibliografię zawierającą 387 pozycji literaturowych. Dodatkowo, zawiera listę publikacji doktorantki, streszczenie w języku polskim i angielskim oraz wykaz stosowanych skrótów, rysunków oraz tabel. Wyniki badań zostały zaprezentowane na 48 rycinach i w 44 tabelach.

W rozprawie można znaleźć drobne błędy o charakterze redakcyjnym, jak np. w tabelach 2-4, zabrakło odnośników literaturowych, jednak znajdują się one w samym tekście, do którego wskazane tabele się odnoszą.

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl

W kilku miejscach doktorantka zastosowała niejednolitą terminologię dotyczącą zastosowanych technik/metod badawczych. Dla przykładu „Brightness Analysis Method", "Molecular Brightness Analysis", czy "Brightness method" są stosowane naprzemiennie.

W tabelach opisujących „Molecular Brightness" stosowane są różne jednostki: mean value [kcounts molecule^{-1} s^{-1}] (Tabela 17), mean value [cnts × 10^2] (Tabele 25 i 26). Wszystkie tabele opisują tę samą wielkość, natomiast sposób przedstawienia jednostek jest różny.

Rozdział „Main results, conclusions and future prospects" stanowi wartościowe podsumowanie uzyskanych wyników i wskazuje możliwe kierunki dalszych badań. Na szczególne podkreślenie zasługuje próba interpretacji uzyskanych wyników w szerszym kontekście biologicznym oraz wskazanie potencjalnych zastosowań opracowanej metody.

Jednocześnie należy zauważyć, że rozdział jest stosunkowo obszerny i w wielu miejscach powtarza informacje przedstawione wcześniej w części „Results and discussion". Część sformułowanych wniosków ma charakter ogólnych rozważań, a nie bezpośrednich konkluzji wynikających z przeprowadzonych badań. Korzystniejsze byłoby wyraźne oddzielenie najważniejszych osiągnięć naukowych od ich szerszej interpretacji oraz odniesienie uzyskanych rezultatów do jasno sformułowanego celu pracy, którego w rozprawie wcześniej formalnie nie przedstawiono.

Praca została napisana poprawnym, zrozumiałym językiem naukowym. Tekst jest klarowny, logiczny i wolny od poważniejszych uchybień. Wskazane przykłady należy uznać za drobiazgi, które nie wpływają na wartość naukową pracy.

4. Oryginalność rozprawy

Rozprawa wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne. Uzyskane wyniki mają wartość poznawczą, zostały rzetelnie udokumentowane oraz właściwie zinterpretowane w oparciu o aktualny stan wiedzy i krytyczną analizę literatury przedmiotu.

Podsumowując, rozprawa jest spójnym i wartościowym opracowaniem naukowym. Przedstawione wyniki wnoszą nową wiedzę dotyczącą mechanizmów oddziaływania małych ligandów z kwasami nukleinowymi oraz pokazują możliwości wykorzystania metod fluorescencyjnych do ilościowej charakterystyki tych procesów. Autorka wykazała się umiejętnością samodzielnego prowadzenia badań naukowych, właściwego doboru metod eksperymentalnych oraz krytycznej analizy uzyskanych wyników.

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl

Jednym z najciekawszych osiągnięć rozprawy jest wykorzystanie analizy jasności molekularnej do ilościowego wyznaczania stałych równowagi kompleksowania małych ligandów z DNA i RNA przy stężeniach nanomolowych. Przedstawione podejście stanowi interesujące rozszerzenie zakresu zastosowań BAM i umożliwia ilościową analizę oddziaływań ligandów z kwasami nukleinowymi z wykorzystaniem pomiarów fluorescencyjnych.

Interesujące jest również określenie frakcji kompleksów niewzbudzanych wskutek orientacji momentów dipolowych w układzie immobilizowanego DNA. Wynik ten stanowi cenne uzupełnienie analizy fluorescencyjnej badanych układów i może być przydatny przy interpretacji podobnych eksperymentów.

Autorka wykazała zdolność YO-PRO-1 do wiązania nie tylko DNA, ale również innych kwasów nukleinowych. Cennym uzupełnieniem badań były eksperymenty przeprowadzone z wykorzystaniem komórek linii HeLa.

5. Uwagi i sugestie

W rozprawie zabrakło odrębnego rozdziału zawierającego cel główny, cele szczegółowe oraz hipotezę badawczą. Ich jednoznaczne sformułowanie ułatwiłoby czytelnikowi ocenę stopnia realizacji założonych zamierzeń.

Rozdział literaturowy jest obszerny i dobrze opracowany, jednak część poświęcona biologii RNA, rybosomom i terapiom mRNA mogłaby zostać przedstawiona bardziej syntetycznie, co poprawiłoby proporcje rozprawy.

Bardzo proszę o uzupełnienie w trakcie obrony następujących informacji:

- W odniesieniu do wyznaczania stałych równowagi z wykorzystaniem analizy jasności molekularnej, jakie warunki eksperymentalne są najbardziej krytyczne dla wiarygodności tej metody i który etap procedury wnosi największą niepewność do końcowego wyniku?
- Wyznaczone w pracy stałe równowagi dotyczą układów modelowych. Jakich zmian wartości tych parametrów należałoby oczekiwać w środowisku komórkowym i jakie czynniki biologiczne mogłyby w największym stopniu wpływać na ich wartość?
- Czy w ocenie Doktorantki metoda BAM może zostać zastosowana do badań bardziej złożonych układów kwasów nukleinowych, takich jak aptamery lub oligonukleotydy terapeutyczne?

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl

6. Podsumowanie i wniosek końcowy

Podsumowując, rozprawa doktorska mgr inż. Karoliny Kucharskiej, stanowi samodzielne, oryginalne opracowanie naukowe, które wnosi nową wartość poznawczą w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych, w dyscyplinie nauki chemiczne.

W mojej ocenie praca spełnia wymagania określone w art. 187 ust. 1 Ustawy z dnia 20 lipca 2018, Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2024 r., poz. 1571 ze zm.) oraz w Regulaminie Warszawskiej Szkoły Doktorskiej Nauk Ścisłych i BioMedycznych. Wnioskuję zatem o dopuszczenie Pani mgr inż. Karoliny Kucharskiej do publicznej obrony rozprawy doktorskiej.

Signed by /
Podpisano przez:

Marta Joanna
Woźniak-Budych

Date / Data: 2026-
07-28 11:06

ul. Wszechnicy Piastowskiej 3, 61- 614 Poznań
tel. +48 61 829 67 04
marta.budych@amu.edu.pl
www.cnbm.amu.edu.pl