



Prof. dr hab. Anna Pasternak

Zakład Bioinżynierii Kwasów Nukleinowych

tel. 61 852 85 03, fax. 61 852 05 32

e-mail: apa@ibch.poznan.pl

Poznań, 25 lipca 2026

Recenzja
rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kurdyn
pt. "Cellular response induced by unsymmetrical bisacridines in
pancreatic cancer cells cultured in 2D and 3D conditions"

Przekazana do recenzji praca doktorska mgr Agnieszki Kurdyn została wykonana pod kierunkiem dr hab. Ewy Augustin, prof. PG na Wydziale Chemicznym Politechniki Gdańskiej. Celem badań prowadzonych przez mgr Agnieszkę Kurdyn było poznanie właściwości trzech nowych, niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny i ich aktywności biologicznej wobec ludzkich komórek raka trzustki.

Tematyka badawcza podjęta w przedstawionej do oceny rozprawie doktorskiej stanowi element intensywnie rozwijanego aktualnie obszaru badań nad związkami niskocząsteczkowymi jako potencjalnymi czynnikami przeciwnowotworowymi. Współczesna onkologia oraz chemia medyczna w coraz większym stopniu opierają się na projektowaniu cząsteczek zdolnych do selektywnej modulacji kluczowych szlaków sygnałowych odpowiedzialnych za proliferację, angiogenezę oraz proces przerzutowania komórek nowotworowych. Warto w tym miejscu podkreślić, że związki niskocząsteczkowe pozostają jedną z najważniejszych klas kandydatów na nowoczesne leki przeciwnowotworowe, a poszukiwanie nowych związków o korzystnym profilu farmakokinetycznym nadal stanowi jeden z priorytetowych kierunków badań w chemii medycznej i farmakologii onkologicznej. W tym kontekście badania przedstawione w rozprawie doktorskiej należy uznać za aktualne, dobrze uzasadnione pod względem naukowym oraz wpisujące się w światowe trendy rozwoju terapii przeciwnowotworowych.

Przekazana do oceny praca doktorska napisana jest w języku angielskim w formie zbioru publikacji. Posiada ona typowy dla tego rodzaju dysertacji układ, rozpoczynający się dobrze zbalansowanym wstępem teoretycznym, przedstawiającym cel podjętych badań oraz zawierającym materiały i metody wykorzystywane w trakcie realizacji doktoratu. Najważniejszą zaś część stanowi cykl trzech publikacji w których mgr Agnieszka Kurdyn jest pierwszą autorką. Co istotne, wszystkie publikacje pochodzą z listy JCR i posiadają dobry lub bardzo dobry współczynnik wpływu. W dysertacji można również znaleźć deklaracje istotnego wkładu Doktorantki w badania wchodzące w skład rozprawy doktorskiej oraz spis pozostałych artykułów, których mgr Kurdyn jest współautorką. Z przedstawionych danych wynika, że Doktorantka jest współautorką ośmiu opublikowanych już prac oraz jednej będącej w trakcie oceny. Jest to w mojej ocenie bardzo dobry dorobek jak na ten etap kariery naukowej. Ponadto, w pracy zamieszczono informacje na temat doniesień konferencyjnych oraz listę otrzymanych stypendiów i

wyróżnień. Wszystko to świadczy zdecydowanie pozytywnie o aktywności naukowej mgr Agnieszki Kurdyn i wskazuje na świetną współpracę pomiędzy Doktorantką a Panią Promotor.

Publikacje, które zostały wskazane jako trzon pracy doktorskiej, tworzą spójny tematycznie cykl artykułów naukowych. Dotyczy on, zgodnie z deklarowanym celem, przeciwnowotworowego działania niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny (UA) wobec ludzkich komórek raka trzustki. Przedstawione artykuły wskazują na wysoki stopień merytorycznego zaawansowania oraz logiczną strukturę badań.

Pierwsza z publikacji rozpoczynających cykl badawczy dotyczy molekularnych mechanizmów indukowania odpowiedzi komórkowej przez asymetryczne bisakrydyny (C-2028, C-2045, C-2053) w warunkach hodowli 2D na czterech liniach komórkowych raka trzustki (Panc-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3). Badania nakierowane zostały w szczególności na charakterystykę mechanizmu indukowanej śmierci komórkowej oraz starzenia komórkowego. Doktorantka wykazała silne działanie cytotoksyczne badanych związków, hamowanie wzrostu komórek nowotworowych z indukcją apoptozy jako głównym mechanizmem oraz przyspieszone starzenie komórkowe linii MIA PaCa-2, które ostatecznie również kończy się apoptozą. We wspomnianej pracy wskazuje ona także na kluczowy mechanizm wyciszenia ekspresji c-Myc oraz nadekspresję białka p21 jako pierwotną ścieżkę odpowiedzi apoptotycznej. Doktorantka ustaliła również stężenia IC_{50} oraz IC_{80} , które stały się punktem odniesienia dla kolejnych prac.

Druga z prezentowanych publikacji przenosi badania do bardziej zaawansowanego fizjologicznie modelu 3D sferoidów wielokomórkowych MCTS. Doktorantka do analiz wykorzystała tu te same wartości IC_{50}/IC_{80} co w pierwszej pracy i wykonała analizy na trzech liniach komórkowych (Panc-1, MIA PaCa-2, AsPC-1). Opisane badania udowodniły, że asymetryczne bisakrydyny zachowują swoją wysoką aktywność proapoptotyczną hamując wzrost sferoidów, które lepiej niż hodowle 2D oddają mikrośrodowisko guza. Badane związki skutecznie penetrowały sferoidy, hamując wzrost i prowadząc do dezintegracji ich struktury, przy czym ich skuteczność zależała od rodzaju linii komórkowej niezależnie od warunków hodowli (2D vs. 3D). Mgr Kurdyn wykazała, że dominującym mechanizmem śmierci komórkowej w modelu 3D była apoptoza. Jednocześnie większość badanych komórek znajdowała się w fazie wczesnej apoptozy, podczas gdy w hodowlach 2D przeważały komórki w fazie późnej apoptozy. Doktorantka wydaje się przy tym zasadnie interpretować te różnice jako konsekwencję opóźnionej kinetyki śmierci komórkowej w modelu sferoidowym, związanej z ograniczoną i stopniową penetracją struktur 3D.

Ostatnia z publikacji wchodzących w skład cyklu artykułów naukowych stanowi swoiste rozszerzenie analizy mechanizmów wcześniejszych badań wzbogacając analizę o proces autofagii oraz wpływ badanych związków na migrację komórek raka trzustki. Analizy biologiczne były wykonywane na czterech nowotworowych liniach komórkowych (Panc-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3) i porównane z nienowotworową linią komórkową hTERT-HPNE. Mgr Kurdyn wykazała dzięki temu, że badane asymetryczne bisakrydyny posiadają znacznie niższą cytotoksyczność względem nienowotworowych komórek trzustki, potwierdzając tym samym ich selektywność. Doktorantka udowodniła również, że badane związki indukują, w sposób niezależny od białka Beclin1, autofagię o zmiennym charakterze, zależnym od linii komórkowej oraz silnie hamują migrację komórek poprzez niekanoniczny mechanizm związany z modulacją markerów EMT.

Powyższe trzy publikacje stanowią w moim przekonaniu bardzo silną podstawę rozprawy doktorskiej. Są spójne, wzajemnie się uzupełniają i dostarczają dowodów na to, że niesymetryczne bisakrydyny mogą być obiecującymi kandydatami w terapii raka trzustki dzięki wielokierunkowemu działaniu (apoptoza, starzenie, autofagia i hamowanie migracji) przy zachowaniu bezpieczeństwa dla komórek zdrowych. Doktorantka konsekwentnie wykorzystała trzy asymetryczne bisakrydyny do logicznego ciągu badań rozpoczynając od poszukiwania podstawowego mechanizmu działania na liniach komórkowych 2D, poprzez walidację swoich obserwacji w hodowlach 3D, a kończąc na pogłębieniu

mechanizmu weryfikacji selektywności działania. Takie podejście stanowi więc nie tylko cenne źródło wiedzy o nowych związkach ale też bogaty opis farmakologiczny potencjalnego leku.

W trakcie lektury samych artykułów naukowych nasunęły mi się pewne pytania dotyczące części zaprezentowanych badań. Jednakże po lekturze całej rozprawy okazało się, że rozprawa jest znacznie bardziej samoświadoma metodologicznie niż sugerowałaby to lektura wyłącznie trzech publikacji z osobna. Moje główne zarzuty początkowo dotyczyły niespójnego panelu linii komórkowych oraz braku niezależnej reoptymalizacji wartości IC_{50} oraz IC_{80} w kolejnych publikacjach. W publikacji nr 2 pominięto linię BxPC-3, która była obecna w publikacjach nr 1 i nr 3. Rozprawa zawiera jednak dedykowany rozdział wyjaśniający tę decyzję. Ponieważ efekt spodziewany po traktowaniu asymetrycznymi bisakrydynami występował już w kontroli, Doktorantka słusznie uznała, że włączenie tej linii uniemożliwiłoby wiarygodną interpretację wyników. Jeżeli natomiast chodzi o brak ponownej optymalizacji stężeń IC_{50}/IC_{80} to jak już wcześniej wspomniałam w recenzji, prace nr 2 i nr 3 opierają się w całości na wartościach wyznaczonych w pierwszym artykule, bez powtórnej walidacji w nowych warunkach. Dodatkowe informacje pojawiły się jednak w rozprawie doktorskiej wykazując, że próba ponownej optymalizacji była podejmowana. Ostatecznie jednak badania zdecydowano się wykonać wg dawek wyznaczonych na liniach komórkowych 2D z logicznym uzasadnieniem. Uważam, że taka decyzja broni się metodologicznie, choć w samej publikacji nr 2 nigdzie nie znalazłam informacji, że tak duże rozbieżności między liniami komórkowymi 2D i 3D w ogóle istnieją i były mierzone. Oznacza to, że publikacja nr 2, czytana samodzielnie, bez rozprawy, jest w tym miejscu niepełna informacyjnie, nawet jeśli decyzja była słuszna merytorycznie.

Zastanawiająca dla mnie jest również niewielka moc statystyczna (zwłaszcza gdy $n=2$) przedstawionych wyników. Przy tak małej liczebności prób istotność statystyczna (szczególnie liczne $p<0.05$ przy $n=2$ na grupę) jest wątpliwa metodologicznie i powinna być traktowana z ostrożnością interpretacyjną w całej serii prac. Nie znalazłam w rozprawie żadnego odniesienia do tego problemu.

Czytając wstęp teoretyczny dotyczący mechanizmu działania asymetrycznych bisakrydyn oraz proponowany mechanizm działania nowych związków wskazujący na ich zaangażowanie w oddziaływanie z promotorem c-Myc zastanawia mnie na ile nowe związki mogą być selektywne względem G-kwadrupleksów. Ponadto, jak zwykle w przypadku badań nad ligandami nakierowanymi na G-kwadrupleksy, zastanawia mnie kwestia ich rzeczywistej selektywności. W genomie występują tysiące potencjalnych sekwencji zdolnych do tworzenia struktur G-kwadrupleksowych, które różnią się długością i sekwencją pętli, topologią oraz regionami flankującymi. Jednocześnie ogrom związków niskocząsteczkowych oddziałuje przede wszystkim z powierzchnią zewnętrzną tetrad guaninowych poprzez oddziaływania warstwowe, a różnicowanie poszczególnych struktur wynika głównie z dodatkowych oddziaływań z pętlami, rowkami czy też z preferencji względem określonej topologii. W związku z tym zastanawiam się, czy w przypadku takich ligandów rzeczywiście można mówić o wysokiej selektywności wobec pojedynczych struktur G-kwadrupleksowych, jak choćby c-Myc, czy raczej o preferencyjnym wiązaniu pewnej klasy G-kwadrupleksów o podobnych cechach strukturalnych. Prosiłabym Doktorantkę o ustosunkowanie się do powyższego zagadnienia podczas publicznej obrony.

Podsumowując, przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska zawiera oryginalne wyniki badań, które wnoszą wartościowy wkład do aktualnego stanu wiedzy w omawianym obszarze badawczym. Uzyskane rezultaty zostały zaprezentowane w sposób przejrzysty i logiczny, a ich interpretacja jest rzetelna, krytyczna oraz oparta na aktualnym stanie wiedzy. Dyskusja wyników świadczy o bardzo dobrym przygotowaniu merytorycznym Doktorantki, umiejętności samodzielnego prowadzenia badań naukowych oraz swobodnym poruszaniu się w problematyce realizowanego projektu doktorskiego. Na podkreślenie zasługuje również umiejętność formułowania trafnych wniosków oraz krytycznej oceny uzyskanych rezultatów w kontekście danych literaturowych. W związku z powyższym stwierdzam, że rozprawa doktorska mgr Agnieszki Kurdyn spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce. Wnoszę zatem do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej o dopuszczenie mgr Agnieszki Kurdyn do dalszych etapów

postępowania w sprawie nadania stopnia doktora. Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej z wnioskiem o wyróżnienie rozprawy doktorskiej mgr Agnieszki Kurdyn i załączam poniżej argumentację wymaganą uchwałą w sprawie wyróżnień rozpraw doktorskich procedowanych w dyscyplinie Nauki Chemiczne na Politechnice Gdańskiej.

Argumentacja wyróżnienia rozprawy

Same związki nie są nowym wynalazkiem tej rozprawy, ponieważ są one już chronione patentami. Rozprawa dostarcza jednak podstaw do dalszego rozwoju przedklinicznego niesymetrycznych bisakrydyn jako kandydatów terapeutycznych w raku trzustki, wykazując na podstawie konkretnych danych ilościowych ich przewagę nad obecnie stosowanymi standardami leczenia oraz zdolność do obchodzenia głównych, znanych mechanizmów lekooporności tego nowotworu. Na szczególną uwagę zasługują:

1. Udokumentowana przewaga ilościowa nad lekami referencyjnymi

Doktorantka wykazała, że skuteczne stężenia UA (IC_{50} rzędu 0,023–0,198 μM w warunkach hodowli 2D) są o 1–2 rzędy wielkości niższe niż stężenia klinicznie stosowanej irynotekanu ($IC_{50} = 8,5 \mu M$ wobec Panc-1) czy gemcytabiny w liniach opornych. W modelu 3D, mimo naturalnego wzrostu wartości IC_{50}/IC_{80} wynikającego z barier dyfuzyjnych sferoidu, przewaga ta utrzymuje się na poziomie ponad 2000-krotnym (np. IC_{50} C-2028 w 3D = 0,020 μM wobec IC_{50} irynotekanu w 3D = 44,3 μM dla Panc-1). Mimo różnic bezwzględnych wartości IC_{50} oraz IC_{80} między modelami 2D i 3D, względna przewaga nad lekami referencyjnymi została zachowana i udokumentowana ilościowo. Jest to precyzyjnie wykazana, powtarzalna różnica ilościowa, a nie ogólna deklaracja wyższej aktywności.

2. Mechanistycznie uzasadnione obchodzenie kluczowej bariery lekooporności

Mutacje *TP53* występują w >50% przypadków raka trzustki i są główną przyczyną oporności na standardowe leki genotoksyczne (działające przez indukcję odpowiedzi zależnej od p53). Rozprawa wykazuje, na czterech liniach o zróżnicowanym statusie p53, że cytotoksyczność UA jest w pełni niezależna od statusu p53, ponieważ ich pierwotnym celem molekularnym jest stabilizacja struktur G-kwadrupleksu w promotorach onkogenów (m.in. *c-MYC*) prowadząca do obniżenia poziomu białka c-Myc. To konkretny, sprecyzowany mechanizm omijania dominującej bariery oporności w tym nowotworze, a nie ogólnikowe stwierdzenie nowości mechanizmu działania.

3. Udokumentowany margines selektywności terapeutycznej

Wartości IC_{80} dla zdrowych komórek trzustkowych (hTERT-HPNE) są co najmniej 2-krotnie wyższe niż odpowiednie wartości dla komórek nowotworowych (np. C-2053: 0,853 μM w komórkach prawidłowych vs 0,080 μM w Panc-1). Precyzyjnie określony margines bezpieczeństwa jest kluczowym parametrem oceny potencjału wdrożeniowego związku, umożliwiającym racjonalne planowanie dalszych badań toksykologicznych.

4. Odwrócenie fizjologicznego mechanizmu oporności na poziomie procesu komórkowego

Autofagia w raku trzustki jest udokumentowanym w literaturze mechanizmem cytoprotekcyjnym, sprzyjającym przeżyciu komórek nowotworowych pod wpływem terapii. Rozprawa precyzyjnie wykazuje, że UA przeprogramowują ten proces z funkcji ochronnej na prośmiertną, w sposób niezależny od Beclin1. Jest to opisany ilościowo, weryfikowalny funkcjonalnie proces, a nie deklaratoryjna obserwacja korelacyjna.

Związki posiadają już ochronę patentową, co oznacza, że infrastruktura własności intelektualnej niezbędna do komercjalizacji jest zabezpieczona. Rozprawa dostarcza jednak brakującego dotąd elementu jakim jest precyzyjny pakiet danych farmakodynamicznych (mechanizm, selektywność,

skuteczność w warunkach 2D i 3D, efekt antymigracyjny) uzasadniający skierowanie związków do badań *in vivo*, co samo w sobie stanowi jasno określony, kolejny krok wdrożeniowy, a nie ogólną deklarację potencjału. W związku z powyższym uważam, że rozprawa doktorska zasługuje na wyróżnienie.