



Prof. dr hab. Michał Pikula
Profesor, Zastępca Dyrektora Pierwszej Szkoły Doktorskiej GUMed
Pracownia Inżynierii Tkankowej i Medycyny Regeneracyjnej
Zakład Embriologii, Katedra Anatomii, Wydział Lekarski
Gdański Uniwersytet Medyczny (GUMed)
ul. Dębinki 1, 80-210 Gdańsk, bud. CBM
tel. 58 3491368 (bezp.); 58 3491495 (sekretariat)
e-mail: pikula@gumed.edu.pl
www.medreg.gumed.edu.pl

Gdańsk, 15.08.2026

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr inż. Agnieszki Kurdyn przygotowana na wniosek Rady Dyscypliny Nauki Chemiczne Politechniki Gdańskiej. Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Rozprawa doktorska mgr inż. Agnieszki Kurdyn pt. „*Cellular response induced by unsymmetrical bisacridines in pancreatic cancer cells cultured in 2D and 3D conditions*” („Odpowiedź komórkowa indukowana przez niesymetryczne bisakrydyny w komórkach raka trzustki hodowanych w warunkach 2D i 3D”) została przygotowana pod kierunkiem Pani prof. dr hab. Ewy Augustin. Praca została napisana w języku angielskim. Praca dotyczy bardzo aktualnego i ważnego obszaru badań naukowych związanych z poszukiwaniem nowych związków przeciwnowotworowych. Praca skupia się na ocenie aktywności związków, niesymetrycznych bisakrydyn wobec komórek raka trzustki, którego leczenie jest ogromnym wyzwaniem medycznym. Wciąż nie istnieją bowiem wystraszająco skuteczne metody leczenia tego nowotworu, zwłaszcza w jego zaawansowanym stadium. Stąd, podjęty przez Doktorantkę oraz Promotor temat uważam za niezwykle istotny klinicznie.

Rozprawa doktorska została przygotowana w układzie obejmującym część teoretyczną poprzedzoną streszczeniami (w j. polskim i angielskim) oraz wykazem skrótów. Następnie zostały opisane cele pracy, materiały i metody, przedstawienie wyników badań w postaci trzech oryginalnych publikacji uzupełnionych wynikami nieopublikowanych, przyszłe badania, wnioski. Praca zawiera również oświadczenia współautorów publikacji oraz osiągnięcia naukowe Doktorantki, piśmiennictwo, wykaz rysunków oraz tabel. Układ rozprawy jest przejrzysty i logiczny, a poszczególne części tworzą spójną całość odpowiadającą realizacji założonego celu badawczego.

Część teoretyczna została podzielona na cztery główne rozdziały, które w sposób logiczny wprowadzają w tematykę rozprawy. Obejmuje ona charakterystykę raka trzustki, w tym jego epidemiologię, etiologię, patogenezę molekularną, heterogenność jak również problemy związane z opornością na leczenie. Następnie omówiono kluczowe procesy komórkowe związane z odpowiedzią komórek nowotworowych, ze szczególnym uwzględnieniem apoptozy, starzenia komórkowego, autofagii oraz migracji i inwazji, procesów które są analizowane w pracy. Kolejna część wprowadzenia poświęcona została pochodnym akrydyny jako potencjalnym związkom przeciwnowotworowym, ze szczególnym uwzględnieniem niesymetrycznych bisakrydyn, ich mechanizmów działania oraz selektywności wobec komórek nowotworowych jak również komórek prawidłowych. Istotnym



elementem części teoretycznej jest również przedstawienie znaczenia zaawansowanych modeli hodowli komórkowej, w tym modeli 3D (organoidów, sferoidów) ich zastosowania w analizie nowych, potencjalnych leków. Część tą uważam za bardzo ważną i przygotowaną w sposób niezwykle rzetelny i skrupulatny. Szczególnie pomocne dla czytelnika są starannie przygotowane schematy i rysunki. Rozdział ten świadczy o dużej wiedzy Doktorantki i szerokim zaznajomieniu się z tematyką pracy.

Po części teoretycznej Doktorantka przedstawiła cele badawcze oraz opis zastosowanych materiałów i metod. Głównym celem pracy wskazanym przez Doktorantkę była kompleksowa charakterystyka aktywności biologicznej oraz mechanizmów działania trzech nowych niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny (C-2028, C-2045 i C-2053) wobec ludzkich komórek raka trzustki. Realizację celu głównego podzielono na trzy zasadnicze kierunki badań oraz cele szczegółowe. Pierwszy zakładał ocenę cytotoksyczności badanych związków oraz ich wpływ na proliferację, zmiany w cyklu komórkowym, apoptozę i starzenie komórkowe w różnych liniach raka trzustki. Dodatkowo zakładano zbadanie także potencjalnych celów molekularnych w szczególności markera c-Myc oraz białek p16, p21, p53 i SMAD4. Drugi kierunek dotyczył oceny działania bisakrydyn w trójwymiarowych modelach sferoidów oraz porównania odpowiedzi komórek w warunkach 2D i 3D. Trzeci cel szczegółowy obejmował analizę wpływu badanych związków na proces autofagii, jej wzajemne powiązania z apoptozą oraz potencjał migracyjny komórek raka trzustki z uwzględnieniem markerów związanych z przejściem epitelialno- mezenchymalnym (EMT). Cele moim zdaniem zostały postawione prawidłowe i odpowiadały tematowi pracy; pozwoliły one na wieloaspektową ocenę zarówno aktywności przeciwnowotworowej badanych bisakrydyn, jak i potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za ich działanie.

Zakres wykorzystanych metod jest szeroki i odpowiadał założonym celom. Obejmował on zarówno klasyczne testy oceny cytotoksyczności w modelach 2D i 3D, jak i analizy z wykorzystaniem cytometrii przepływowej, mikroskopii, Western blot, oceny autofagii, starzenia komórkowego, aktywności kaspaz, zdolności migracyjnych oraz tworzenia kolonii. Badania przeprowadzono z wykorzystaniem modeli komórkowych hodowanych zarówno w układzie monowarstwowym, jak i w postaci sferoidów. Pozwoliło to na szeroką ocenę odpowiedzi komórek raka trzustki na działanie badanych niesymetrycznych bisakrydyn.

Zasadniczą część rozprawy stanowią trzy oryginalne wieloautorskie artykuły naukowe wydawnictw o zasięgu międzynarodowym, uzupełnione o dodatkowe, niepublikowane wyniki.

1. c-Myc inhibition and p21 modulation contribute to unsymmetrical bisacridines-induced apoptosis and senescence in pancreatic cancer cells. *Pharmacological Reports* (2025) 77:182–209; doi: 10.1007/s43440-024-00658-6. IF2024 = 3.8, Q1, Pkt. Min.100.
2. Pro-Apoptotic Effects of Unsymmetrical Bisacridines in 3D Pancreatic Multicellular Tumor Spheroids. *International Journal of Molecular Sciences* (2025) 26, 7557; doi: 10.3390/ijms26157557. IF2024 = 4.9, Q1, Pkt. Min.140.



3. Apoptosis-promoting autophagy mediates anti-migratory effects of unsymmetrical bisacridines in pancreatic cancer cells. *Biomedicine & Pharmacotherapy* (2025) 193, 118786; doi: 10.1016/j.biopha.2025.118786. IF2024 = 7.5, Q1. Pkt. Min. 100.

Przedstawione prace tworzą spójną całość, przechodząc od charakterystyki podstawowych efektów cytotoksycznych i mechanizmów śmierci komórkowej indukowanych przez badane związki, przez ich weryfikację w modelach 3D, aż do analizy roli autofagii i migracji komórek. Co istotne w każdej z prac Doktorantka jest pierwszą Autorką. Na podstawie oświadczeń Współautorów można również stwierdzić, iż udział Doktorantki w powstawaniu tych publikacji był kluczowy.

Pierwsza publikacja (1) koncentruje się na określeniu aktywności trzech bisakrydyn (C-2028, C-2045 i C-2053) w modelach 2D raka trzustki. Wykorzystano w pracy linie komórkowe raka trzustki Panc-1, MIA PaCa-2, AsPC-1, BxPC-3 oraz linie nienowotworową hTERT-HPNE. Wykazano, że badane związki charakteryzują się wyższą cytotoksycznością wobec komórek nowotworowych niż wobec prawidłowych komórek nabłonka trzustki. Zidentyfikowano apoptozę jako główny mechanizm indukowanej śmierci komórkowej oraz wykazano udział SMAD4 i obniżenie poziomu onkoproteiny c-Myc, przy czym efekt związany z c-Myc zachodził niezależnie od p53. Ponadto stwierdzono także indukcję zależnego od dawki starzenia komórkowego, związanego ze wzrostem poziomu p21, a następnie przechodzenie komórek starzejących się w kierunku komórek apoptotycznych.

Druga publikacja (2) stanowi rozszerzenie badań o bardziej zaawansowany model hodowli 3D w postaci wielokomórkowych sferoidów nowotworowych. Wykorzystano w pracy trzy rodzaje linii komórkowych Panc-1, MIA PaCa-2, AsPC-1. Ważnym elementem pracy było zoptymalizowanie tworzenia sferoidów w warunkach *in vitro*. Wykazano, że badane bisakrydyny zachowują aktywność przeciwnowotworową również w warunkach 3D, prowadząc do zmian morfologii i zahamowania wzrostu sferoidów jak również istotnego obniżenia żywotności komórek. Potwierdzono również, że apoptoza jest dominującym mechanizmem śmierci komórkowej w tym modelu. Interesującym wynikiem było wykazanie, że poszczególne związki wykazywały podobną specyficzność wobec określonych linii komórkowych niezależnie od zastosowanego modelu hodowli; podkreśla to znaczenie właściwości genotypowych i fenotypowych komórek w ocenie aktywności potencjalnych leków.

Trzecia publikacja (3) rozwija wcześniejsze obserwacje poprzez analizę roli autofagii oraz jej związku z apoptozą i migracją komórek raka trzustki. Wykazano, że bisakrydyny zwiększają przepływ autofagiczny w sposób zależny od linii komórkowej i niezależny od Beclin1. Analiza wzajemnych zależności pomiędzy autofagią i apoptozą wskazała na ich złożony, lecz przede wszystkim prośmiertciowy charakter. Jednocześnie wszystkie badane związki istotnie hamowały migrację komórek raka trzustki, a efekt ten był powiązany z aktywnością autofagii i zmianami w markerach związanych z przejściem epitelialno-mezenchymalnym.



Podsumowując, trzy publikacje tworzą logiczny ciąg badawczy, w którym mgr Agnieszka Kurdyn przechodzi od oceny podstawowej aktywności przeciwnowotworowej bisakrydyn, poprzez potwierdzenie ich działania w modelu 3D, do pogłębionej analizy mechanizmów odpowiedzialnych za ich działanie. Wyniki wskazują na wielokierunkową aktywność badanych związków, obejmującą przede wszystkim indukcję apoptozy, starzenia komórkowego i autofagii oraz hamowanie migracji komórek raka trzustki. Szczególnie wartościowe jest wykazanie selektywności działania wobec komórek nowotworowych oraz zachowania aktywności w bardziej złożonym modelu 3D.

Wnioski przedstawione w rozprawie doktorskiej stanowią podsumowanie najważniejszych wyników zarówno opublikowanych jak również tych nieopublikowanych. Doktorantka wskazuje na selektywną cytotoksyczność niesymetrycznych bisakrydyn wobec komórek raka trzustki, ich wpływ na szlak c-Myc/p21, indukcję apoptozy i starzenia komórkowego, a także zachowanie ich aktywności w modelach 3D. Ponadto Doktorantka podkreśla ważny aspekt indukowanej autofagii oraz hamowanie migracji testowanych komórek nowotworowych. Wnioski są moim zdaniem logiczne, spójne z przedstawionymi wynikami i dobrze oddają najważniejsze wyniki i osiągnięcia badawcze recenzowanej rozprawy. Na szczególne podkreślenie zasługuje ich wieloaspektowy charakter, odzwierciedlający złożone mechanizmy działania badanych bisakrydyn. Wnioski wskazują również na potencjalne znaczenie uzyskanych wyników dla dalszych badań nad nowymi strategiami leczenia raka trzustki. Jednocześnie aplikacyjny charakter wyników należy traktować jako perspektywę wymagającą dalszej walidacji w badaniach przedklinicznych.

Praca pod względem naukowym jest z pewnością na bardzo wysokim poziomie. Mam jednak kilka uwag i pytań, które prosiłbym aby Doktorantka wyjaśniła podczas publicznej obrony pracy doktorskiej. Zastosowanie 7-AAD pozwoliło na ocenę populacji komórek o zaburzonej integralności błony; te wyniki zostały dodatkowo zweryfikowane za pomocą barwienia Annexin V/PI oraz obrazowania fluorescencyjnego. Na ile, zdaniem Doktorantki możliwe jest bezpośrednie porównanie odsetka komórek 7-AAD+ pomiędzy modelami 2D i 3D, biorąc pod uwagę odmienne warunki hodowli, dostępność tlenu i składników odżywczych oraz potencjalnie różną penetrację badanych związków? Dodatkowo, chciałbym zapytać czy zastosowane odczynniki/zestawy używane do badania sferoidów były również dedykowane, rekomendowane do tego typu analiz np. analiza starzenia. Część odczynników z pewnością ma utrudniony dostęp do rdzenia sferoidu i są stosowane rutynowo do badania komórek hodowanych klasycznie w jednej warstwie. Czy Doktorantka przeprowadzała ocenę efektywności penetracji zastosowanych barwników (calcein AM, PI oraz Annexin V-FITC) w całej objętości sferoidów o średnicy około 450 μm ? Jaka była rzeczywista głębokość obrazowania i czy analizowane obrazy obejmowały cały sferoid, czy jedynie jego powierzchniowe warstwy? Czy zastosowana procedura barwienia Annexin V-FITC/PI została zwalidowana pod kątem wykrywania komórek apoptotycznych znajdujących się w głębszych warstwach sferoidu?

W jednym z badań cytometrycznych analizowano 16-48 sferoidów w zależności od linii komórkowej, natomiast wyniki przedstawiono dla $n=4$. Czy jednostką eksperymentalną były niezależne doświadczenia, w ramach których analizowano pulę sferoidów, czy pojedyncze



sferoidy? W przypadku obrazowania części sferoidów doświadczenia wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach ($n=2$). Czy obrazowanie miało charakter wyłącznie jakościowy, służący wizualnemu potwierdzeniu wyników cytometrii, czy też przeprowadzano ilościową analizę uzyskanych obrazów? Dodatkowo, prosiłbym Doktorantkę o wskazanie ograniczeń tego typu badań bazujących na liniach komórkowych bez wykorzystania pierwotnych komórek nowotworowych pochodzących od pacjentów. Wskazane pytania, uwagi nie umniejszają jednak poziomu naukowemu całej pracy. Służą jedynie wykazaniu i wyjaśnieniu niektórych jej aspektów metodycznych.

Przedstawiona rozprawa stanowi oryginalne rozwiązanie problemu naukowego i wnosi istotny wkład w rozwój wiedzy dotyczącej biologicznego działania nowych związków o potencjalnej aktywności przeciwnowotworowej oraz mechanizmów odpowiedzi komórek raka trzustki na ich działanie. Na szczególne podkreślenie zasługuje kompleksowe podejście badawcze, obejmujące analizę cytotoksyczności oraz mechanizmów śmierci komórkowej, starzenia, autofagii i migracji komórek z wykorzystaniem zarówno klasycznych modeli 2D, jak i bardziej zaawansowanego modelu 3D (sferoidy). Uzyskane wyniki mają istotną wartość poznawczą i mogą stanowić podstawę do dalszych badań nad zastosowaniem niesymetrycznych pochodnych bisakrydyny w terapii nowotworów, w szczególności raka trzustki.

Wysoki poziom merytoryczny rozprawy, szeroki i odpowiednio dobrany warsztat badawczy, oryginalność uzyskanych wyników oraz ich znaczenie dla poznania mechanizmów działania badanych związków jak również dorobek publikacyjny Doktorantki pozwalają stwierdzić, że Pani mgr inż. Agnieszka Kurdyn wykazuje wysoką wiedzę teoretyczną i praktyczną oraz umiejętność samodzielnego prowadzenia pracy naukowej.

Podsumowując, stwierdzam, że rozprawa doktorska Pani mgr inż. Agnieszki Kurdyn pt. „Cellular response induced by unsymmetrical bisacridines in pancreatic cancer cells cultured in 2D and 3D conditions” spełnia wymagania określone w art. 187 ustawy z dnia 20 lipca 2018 r., Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2018 r. poz. 1668 z późniejszymi zmianami) i wnioskuję o dopuszczenie Pani mgr inż. Agnieszki Kurdyn do dalszych etapów postępowania w sprawie nadania stopnia doktora w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych w dyscyplinie nauki chemiczne.

Z poważaniem

Prof. dr hab. Michał Pikuła