

dr hab. Ewa Augustin
Katedra Technologii Leków i Biochemii
e-mail: ewa.augustin@pg.edu.pl

Gdańsk, 22.09.2025 r.

**Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Marioli Gimły
pt.**

***Mechanizmy działania pochodnej kwasu usninowego wobec
komórek nowotworu trzustki***

Mechanisms of action of usnic acid derivative against pancreatic cancer cells

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Marioli Gimły pt. „*Mechanizmy działania pochodnej kwasu usninowego wobec komórek raka trzustki*” została wykonana na Wydziale Biologii Uniwersytetu Gdańskiego pod opieką prof. dr hab. Anny Herman-Antosiewicz oraz dr Aleksandry Hać (promotor pomocniczy).

Podstawą rozprawy doktorskiej są 2 oryginalne prace badawcze, z których jedna jest na etapie recenzji oraz 1 praca przeglądowa, wszystkie stanowią zwarty cykl tematyczny, opublikowane w latach 2023-2025 w czasopismach będących na liście JCR:

1. **Gimła Mariola**, Herman-Antosiewicz Anna (2024) Multifaceted properties of usnic acid in disrupting cancer hallmarks, *Biomedicines* 12 (10): 2199.
DOI:10.3390/biomedicines12102199.
2. **Gimła Mariola**, Pyrczak-Felczykowska Agnieszka, Malinowska Marcelina, Hać Aleksandra, Narajczyk Magdalena, Bylińska Irena, Reekie Tristan, Herman-Antosiewicz Anna (2023) The pyrazole derivative of usnic acid inhibits the proliferation of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo, *Cancer Cell International* 23(1): 210.
DOI:10.1186/s12935-023-03054.
3. **Gimła Mariola**, Hać Aleksandra, Reekie Tristan, Herman-Antosiewicz Anna. Impact of usnic acid pyrazole derivative on the metastatic potential and mitochondria of pancreatic cancer cells - manuskrypt złożony do redakcji *BMC Cancer*, w trakcie recenzji.

We wspomnianych pracach Doktorantka jest pierwszym autorem i brała udział w opracowaniu koncepcji badawczej, planowaniu i przeprowadzaniu większości

eksperymentów, analizie i interpretacji wyników, a także w pisaniu publikacji i dyskusji z recenzentami, co potwierdzają dołączone oświadczenia współautorów.

Cykl 3 publikacji został umieszczony w rozprawie doktorskiej w formie załączników, omówiony i zakończony oświadczeniami współautorów. Ponadto w pracy znalazł się wykaz skrótów, streszczenie w języku polskim i angielskim, wprowadzenie (7 stron), cele pracy, materiały i metody (5 stron), podsumowanie oraz spis literatury. Doktorantka wskazała również źródła finansowania prowadzonych przez siebie badań. Rozprawa została przygotowana bardzo starannie, w sposób uporządkowany, czyta się ją z dużą przyjemnością. Prace eksperymentalne zostały dobrze zaplanowane i zrealizowane, a dobór metod badawczych jest adekwatny do postawionego celu badawczego.

Wyniki badań zawarte w rozprawie dotyczą mechanizmu działania pirazolowej pochodnej kwasu usninowego, oznaczonej w rozprawie jako 5, wobec komórek nowotworu trzustki.

Choroby nowotworowe stanowią jedno z ważniejszych wyzwań współczesnej medycyny, a rak trzustki jest jednym z najbardziej agresywnych typów nowotworów u ludzi. Szacuje się, że w ciągu najbliższych 10 lat stanie się on drugą najczęstszą przyczyną zgonów z powodu nowotworów. Mutacje w proto-onkogenie *KRAS*, jak również w genach supresorowych *CDKN2A*, *TP53* i *SMAD4/DPC4* to główne zmiany genetyczne związane z deregulacją cyklu komórkowego, hamowaniem apoptozy, inwazją, przerzutowaniem i ogólnymi słabymi wynikami leczenia tego typu nowotworu. Ponadto, rak trzustki charakteryzuje nadmierna desmoplazja, co utrudnia penetrację leków do komórek nowotworowych, a komórki mikrośrodowiska guza sprzyjają proliferacji i inwazyjności komórek nowotworowych, a także tłumią odpowiedź ze strony układu immunologicznego. Z uwagi na powyższe, optymalizacja terapii pacjentów z rakiem trzustki jest ogromnym wyzwaniem, co skutkuje ciągłym poszukiwaniem nowych, skuteczniejszych leków wobec tego nowotworu. Naturalne związki, w tym kwas usninowy (UA), należący do metabolitów wtórnych porostów, ze względu na swoje różnorodne właściwości biologiczne, w tym przeciwnowotworowe, jest szeroko badany w kontekście działania na różne komórki nowotworowe. Jednak wadą jego jest to, że efekt antynowotworowy uzyskuje się w bardzo wysokich stężeniach tego związku, a to z kolei wiąże się z silną hepatotoksycznością. Stąd zsyntetyzowano wiele aktywnych pochodnych kwasu usninowego, w tym badaną przez panią mgr Mariolę Gimłę pochodną oznaczoną jako 5.

Celem prowadzonych przez doktorantkę badań była weryfikacja hipotezy, czy zmodyfikowana pirazolowa pochodna kwasu usninowego (pochodna oznaczona w pracy jako 5) wykaże wyższy potencjał antyproliferacyjny i przeciwnowotworowy wobec komórek nowotworu trzustki w porównaniu do działania kwasu usninowego. Doktorantka uwzględniła takie aspekty jak: wpływ pochodnej 5 na żywotność i morfologię komórek, przebieg cyklu komórkowego, indukcję śmierci komórkowej, zdolność do migracji i inwazji, wpływ na ER i

mitochondria, a także wzrost guza *in vivo*. Zbadała również skuteczność działania pochodnej 5 z inhibitorem glikolizy, 3-bromopirogronianem (3-BrPA) na wybranym modelu nowotworu trzustki.

Doktorantka bardzo szczegółowo omówiła wyniki badań uzyskane w przedstawionych do oceny publikacjach, stąd ograniczę się w tym miejscu do podania najważniejszych w mojej opinii osiągnięć rozprawy doktorskiej:

- Badana pochodna kwasu usninowego 5 wykazała wysoką aktywność cytotoksyczną wobec komórek ludzkich raków trzustki Panc-1 i Mia PaCa-2 oraz przeciwnowotworową wobec ksenoprzeszczepów raka trzustki Mia PaCa-2 na nagie myszy. Co ważne, pochodna 5 okazała się skuteczniejsza w działaniu niż szeroko badany kwas usninowy.
- Pochodna 5 hamowała cykl komórkowy w fazie G0/G1 oraz indukowała śmierć, głównie apoptotyczną, u podłoża której leży stres związany z ER.
- Badany związek wykazywał również potencjał antymetastatyczny poprzez hamowanie migracji i inwazji komórek raka trzustki, na co wskazuje poziom markerów EMT, zwłaszcza białka Klaudyny-1.
- Pochodna 5 wpływała na metabolizm energetyczny komórek nowotworowych, co wiązało się m.in. ze spadkiem poziomu ATP, a kombinacja działania badanego związku z inhibitorem glikolizy 3-bromopirogronianem potęgowała ten efekt.

Podsumowując uzyskane przez Doktorantkę wyniki, badana pirazolowa pochodna kwasu usninowego działa wielokierunkowo na nowotwór trzustki, poprzez hamowanie podziałów komórkowych, indukcję śmierci, ograniczenie ich migracji i inwazji, wpływ na metabolizm komórkowy. Może zatem w przyszłości być obiecującym kandydatem do dalszych badań związanych z poprawą terapii raka trzustki.

Recenzowanie prac doktorskich stanowiących cykl powiązanych ze sobą publikacji nie jest łatwe, ponieważ artykuły już wcześniej zostały podane wnikliwej ocenie przez niezależnych ekspertów w procesie recenzji związanej z ich publikacją. Tym nie mniej mam kilka uwag, do których chciałabym aby doktorantka się ustosunkowała podczas publicznej obrony.

- *W publikacji nr 2 Doktorantka badała m.in. cytotoksyczność związku nr 5 wobec komórek raka trzustki Panc-1 i Mia PaCa-2 oraz wobec prawidłowych fibroblastów skórnych HDFa. Różnica w cytotoksyczności zdaje się maleć wraz ze wzrostem czasu inkubacji z badanym związkiem, zwłaszcza w przypadku linii Panc-1. Czy gdyby wydłużyć czas o kolejne 24 h to różnica być może byłaby żadna? Proszę Doktorantkę o skomentowanie tego wyniku.*
- *Dalej publikacja nr 2: analiza cyklu komórkowego wskazała na akumulację/blok? komórek nowotworowych w fazie G0/G1, silniejszą dla pochodnej 5 niż UA. Tutaj zabrakło mi histogramów z tej analizy cytometrycznej, które pokazałaby ten efekt lepiej*

niż dane w tabelce. Również, skoro analizowana była dalej śmierć komórkowa testem aneksyna V/7-AAD (tu też widziałabym histogramy), to z pewnością pojawiała się w cyklu komórkowym tzw. frakcja sub-G1, ale nie była ona (czemu?) przedmiotem analizy Doktorantki.

- Czy Doktorantka rozważała fakt indukcji przez badany związek 5 procesu starzenia komórkowego, biorąc pod uwagę blok w fazie G0/G1 i ze względu na fakt, że tylko część populacji komórek (zwłaszcza Panc-1) ulegała śmierci apoptotycznej?*
- Proszę o komentarz, dlaczego działanie badanego związku było skuteczniejsze wobec komórek linii Mia PaCa-2 (choćby w większym stopniu ulegały śmierci) niż komórek linii Panc-1?*
- Czy Doktorantka widzi potrzebę prowadzenia dalszych, bardziej zaawansowanych badań dotyczących pochodnej kwasu usninowego na modelach 3D lub organoidach?*
- W opisie materiałów i metod zabrakło mi podania, jakimi stężeniami badanych związków traktowane były komórki nowotworowe.*

Przedstawione powyżej pytania i sugestie mają charakter dyskusyjny i nie obniżają mojej pozytywnej oceny pracy doktorskiej.

Wniosek końcowy

Podsumowując, wyniki uzyskane przez panią mgr Mariolę Gimłę stanowią istotny i oryginalny wkład naukowy w zakresie prezentowanej tematyki badawczej. Doktorantka osiągnęła wszystkie zamierzone cele badawcze. Wysoko oceniam wartość merytoryczną rozprawy oraz osiągnięcia naukowego przedstawionego w formie cyklu monotematycznych, oryginalnych prac. Oceniając całkowity dorobek Doktorantki należy wspomnieć, że jest ona współautorką łącznie 5 publikacji (jedna aktualnie w recenzji) z listy filadelfijskiej (3 bezpośrednio dotyczą rozprawy doktorskiej) oraz 3 patentów krajowych, co na tym etapie pracy naukowej jest bardzo dobrym osiągnięciem. Wyniki badań prezentowane były łącznie na 9 konferencjach międzynarodowych i krajowych. Kierowała również 2 projektami finansowanymi przez Uniwersytet Gdański.

Z pełnym przekonaniem i jednoznacznie stwierdzam, że przedstawiona do oceny rozprawa doktorska spełnia wymogi stawiane pracom doktorskim określone w art. 187 ust. 1 i 2 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018 r., poz. 1668 z późn. zm.). Jednocześnie zwracam się do Rady Dyscypliny Nauk Biologicznych Uniwersytetu Gdańskiego z prośbą o dopuszczenie mgr Marioli Gimły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Dr hab. Ewa Augustin