



Prof. dr hab. Michał Żmijewski,
Prorektor ds. Nauki
Kierownik Katedry
Katedra Histologii,
Gdański Uniwersytet Medyczny,
ul. Dębinki 1a, Pokój 32
80-210 Gdańsk, Pomorskie
Polska
Tel: +48 583491455
Email: mzmijewski@gumed.edu.pl

Gdańsk, 29.09.2025

Recenzja rozprawy doktorskiej Pani mgr Marioli Gimły

Tematem przedstawionej do recenzji rozprawy doktorskiej **Pani mgr Marioli Gimły** jest:
„Mechanizmy działania pochodnej kwasu usninowego wobec komórek nowotworu trzustki”.

Promotor pracy: **prof. dr hab. Anna Herman-Antosiewicz**, Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański w Gdańsku.

Promotor pomocniczy: dr Aleksandra Hać, Katedra Biologii i Genetyki Medycznej, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański w Gdańsku.

1) Ocena merytoryczna

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska przygotowana została w formie zbioru trzech prac naukowych, na podstawie, Art. 179 ust. 6-9 Ustawy z dnia 3 lipca 2018 r. Przepisy wprowadzające ustawę - Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. z 2018 r., poz. 1669 z późn. zm.). Manuskrypt zawiera, aż 150 numerowanych stron, w tym: w wykaz prac oraz źródeł finansowania badań; obszerny wykaz skrótów; streszczenia w języku polskim i angielskim; wprowadzenie; cele pracy; materiały i metody; omówienie prac; podsumowanie; bibliografia; oraz kopie trzech manuskryptów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej, wraz z oświadczeniami współautorów.

Artykuły włączone do rozprawy:

P(1) Gimła Mariola, Herman-Antosiewicz Anna (2024) Multifaceted properties of usnic acid in disrupting cancer hallmarks, *Biomedicines* 12 (10): 2199.

P(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.

P(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 - *BMC Cancer*, w trakcie recenzji.

Rozprawa opiera się na publikacjach naukowych, to jednak należy zauważyć, że jedna z załączonych prac jest jeszcze w trakcie recenzji (Praca P(3)).

a) trafność podjętej tematyki i jej oryginalność.

Nowotwory stanowią poważny problem zarówno medyczny, jak i społeczny, powodując śmierć milionów osób rocznie. Postęp naukowy ostatnich lat, w tym wprowadzenie terapii biologicznej, przyczynia się do coraz skuteczniejszej walki z nowotworami, jednak nadal resekcja i/lub kombinacja różnych metod terapeutycznych, chociaż wydłuża czas wolny od choroby, to nie zawsze zapobiega wznowom. Jest to szczególnie istotne w przypadku raka trzustki, które jest trzeci pod względem śmiertelności nowotwór, a skuteczność dostępnych schematów terapeutycznych jest ograniczona. **Mgr Mariola Gimła** podjęła się w swojej pracy doktorskiej próby oceny aktywności biologicznej pochodnych kwasu usninowego, który to jest naturalny metabolitem wtórnym porostów. Mimo, dobrze scharakteryzowanej aktywności biologicznej wobec wielu typów komórek nowotworowych, zastosowanie kwasu usninowego może być problematyczne z uwagi na dość wysokie stężenie, przy którym obserwuje się efekty przeciwnowotworowe tego związku. Zespół prof. Anny Herman-Antosiewicz już od wielu lat bada pochodne kwasu usninowego w celu wyselekcjonowania związku o najwyższym potencjale biologicznym. Celem prezentowanej do oceny rozprawy doktorskiej była ocena, czy modyfikacja struktury kwasu usninowego prowadząca do powstania pirazolowej pochodnej 5, zwiększy aktywność antyproliferacyjną i antynowotworową tego związku wobec ludzkich komórek nowotworowych trzustki. Wydaje się, że cykl 3 prac poświęconych temu zagadnieniu stanowi spójne tematycznie i bardzo wszechstronne podejście do tematu.

b) ocena uzyskanych rezultatów

Rozprawa doktorska Pani mgr **Marioli Gimły** oparta została o dobrze zaplanowane badania polegające na obserwacji efektów biologicznych nowych pochodnych kwasu usninowego, zsyntezowanych przez zespół dr Tristana Reekie ze School of Science University of New South Wales Canberra, Australia.

Wśród najistotniejszych wniosków wynikających z przedstawionych badań, należy wymienić:

1. Pochodna 5 kwasu usninowego wykazuje znacznie większy potencjał antyproliferacyjny i cytotoksyczny od samego kwasu usninowego w różnych liniach komórek nowotworowych.
2. Potencjalny mechanizm działania pochodna 5 kwasu usninowego, obejmuje indukcję stresu siateczki śródplazmatycznej (ER), tworzenie wakuoli, hamowanie cyklu komórkowego w fazie G0/G1; co prowadzi do śmierci komórek.
3. Pochodna 5 kwasu usninowego wykazuje aktywność antynowotworową na modelu komórkowy raka trzustki *in vitro* i *in vivo*. Co istotne, nie zaobserwowano efektów ubocznych terapii u zwierząt.
4. Pochodna 5 kwasu usninowego skutecznie hamuje migrację i inwazyjność komórek raka trzustki, co wskazuje na jej potencjał antymetastatyczny.
5. Pochodna 5 kwasu usninowego wpływa na morfologię mitochondriów oraz ogranicza poziom ATP, co może tłumaczyć jego antynowotworowe właściwości; działając w tym kontekście synergistycznie z inhibitorem glikolizy, 3-BrPA.

Wnikliwa analiza przedstawionych wyników skłania mnie do zadania paru pytań oraz sformułowania sugestii do dalszych badań.

1. W artykule **P(2)** tak naprawdę umieszczone są wyniki aktywności pochodnej 5 w różnych liniach komórkowych (raka piersi, szyjki macicy, płuc, wątroby jelita grubego i trzustki). Natomiast tytuł sugeruje, że praca dotyczy badań nad rakiem trzustki. Trzeba zaznaczyć, że wszystkie doświadczenia (oprócz pomiaru wapnia w cytozolu), zostały również wykonane na liniach komórkowych wywodzących się z raka trzustki. Natomiast „brakujący” eksperyment znalazł się w pracy P(3) oraz jako dodatkowy rysunek umieszczony w podpunkcie 12.2.1 rozprawy.
2. Przedstawione wyniki w pracy P(2) wskazują, że aktywność kwasu usninowego jest bardzo niewielka podczas gdy wyniki cytowane w pracy przeglądowej P(1) wskazują, że związek ten wykazuje pewną aktywność przeciwnowotworową i to na tych samych liniach, które badano w pracy P(2).
3. Jestem ciekaw na jakiej podstawie stwierdzono, że źródłem wakuolizacji jest ER (Publikacja P(2) Fig. 4).
4. Na rysunku (Fig. 3) w publikacji P(3), znajdują się powielone fragmenty pokazujące β -aktynę, co generalnie uznawane jest za niewłaściwe. Należałoby to zmienić i użyć właściwych fragmentów membrany (np. 3 z 4 prążków reprezentujących β -aktynę w panelu „epithelial” to ten sam fragment membrany z tymi samymi prążkami). Warto to zrobić przed ostateczną publikacją.
5. Czy do badania aktywności mitochondriów nie można było wykorzystać urządzenia typu Agilent Seahorse? Dałoby to szerszy kontekst badawczy, z możliwością pomiaru zarówno oddychania tlenowego, jak i glikolizy.

Omawiając publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej, należy również docenić, pracę przeglądową P(1). Jest to bardzo rozbudowane, bo aż 26 stronicowe, podsumowanie stanu naszej obecnej wiedzy na temat przeciwnowotworowych właściwości kwasu usninowego. Autorki bardzo skrupulatnie i rzetelnie przedstawiają wszystkie najważniejsze doniesienia dotyczące mechanizmów aktywowanych przez kwas usninowy i jego pochodne. Praca uzupełniona jest o bardzo rozbudowany schemat przedstawiający wewnątrzkomórkowe szlaki sygnalizacyjne, białka oraz procesy będące celem dla aktywności tego naturalnego związku. Dodatkowo praca przeglądowa zawiera tabelę podsumowującą antynowotworowe właściwości kwasu usninowego z podziałem na źródło komórek nowotworowych (organy), podaniem wartości IC_{50} , oraz krótkim opisem uzyskanych wyników. Bardzo ciekawe są również rozdziały opisujące potencjalne zastosowanie kwasu usninowego w terapii z uwzględnieniem terapii łączonej. W nawiązaniu do tych rozważań, bardzo obiecująco przedstawiają się wyniki przedstawione w pracy P(3), w której wykazano synergistyczny efekt działania pochodna 5 kwasu usninowego z inhibitorem glikolizy, 3-BrPA. Tak więc praca P(1) z pewnością stanowi świetne wprowadzenie w tematykę rozprawy i dostarcza wielu interesujących obserwacji.

Oceniając, całościowo publikacje będące podstawą rozprawy doktorskiej mgr Gimły, warto podkreślić bardzo kompleksową analizę właściwości kwasu usninowego oraz jego pochodnych, zarówno teoretycznie, jak i praktycznie zarówno na modelach *in vitro*, jak i *in vivo*. Ciekaw jestem jakie są dalsze plany badawcze. Czy doktorantka zajmie się dokładniejszym badaniem mechanizmów molekularnych aktywowanych przez badane związki, skupi się na interakcji

z innymi potencjalnymi terapeutykami, czy też będzie dążyła do zastosowania pochodnych kwasu usninowego w terapii przeciwnowotworowej?

c) poprawność formalno-językowa, stylistyczna i interpunkcyjna, sposób prezentacji.

Rozprawa napisana jest poprawnie pod względem językowym, zarówno część wstępna oraz omówienie publikacji, jak również same publikacje napisane w języku angielski.

2) Ocena metodologiczna

a) dobór literatury, umiejętność wykorzystania źródeł

Praca **Pani mgr Marioli Gimły** zawiera 91 dobrze dobranych odnośników literaturowych, a 40% z nich pochodzi z ostatnich 5 lat. Świadczy to o rosnącym zainteresowaniu kwasem usninowym w świecie naukowym oraz o tym, że doktorantka wykazuje się dobrą znajomością, starszej jak i najnowszej literatury.

b) poprawność formułowania problemów i hipotez (założeń badawczych).

Podjęta tematyka jest jak najbardziej aktualna, nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również uzyskane wyniki badań pomogą lepiej zrozumieć działanie naturalnych związków biologicznie czynnych oraz ocenić możliwości ich potencjalnego zastosowania w praktyce. Cel pracy jest jasny („Celem niniejszej pracy było porównanie jej aktywności wobec komórek ludzkiego nowotworu trzustki z aktywnością związku wyjściowego i poznanie mechanizmów jej działania”).

Mgr Mariola Gimła formułuje również, dwa bardzo konkretne, ale zarazem szczegółowe cele badawcze, które można uprościć do:

1. Porównanie aktywności biologicznej pochodnej 5 kwasu usninowego do kwasu usninowego w komórkowym modelu nowotworu trzustki.
2. Określenie skuteczności terapii łączonej z wykorzystaniem pochodnej 5 i inhibitora glikolizy (3-BrPA) w komórkowym modelu nowotworu trzustki.

Natomiast formułowane przez doktorantkę wnioski wynikają wprost z poprawnej realizacji hipotezy badawczej (najważniejsze wnioski omówione są powyżej).

c) trafność doboru metod i narzędzi badawczych, umiejętność ich zastosowania.

Na szczególną uwagę zasługuje różnorodność metod badawczych, które umożliwiły kompleksową analizę aktywności biologicznej badanych związków. Ocenę warsztatu badawczego, ułatwia skrótowy opis stosowanych metod i materiału umieszczony jako rozdział 8, w rozprawie doktorskiej mgr Gimły. Warto podkreślić, że za syntezę związków odpowiedzialny był zespół chemików pod kierownictwem dr Tristana Reekie ze School of Science University of New South Wales Canberra, Australia. Natomiast procedura syntezy, jak i wykorzystanie kwasu usninowego oraz jego pochodnych do terapii nowotworów podlega ochronie patentowej (Pat. 239308, Pat.246171, Pat.246172). Należy podkreślić, że mgr Gimła jest wymieniona wśród autorów wynalazku, co podkreśla jej udział w badaniach.

Mgr Gimła posługuje się sprawnie wieloma technikami biologii komórki (hodowle komórkowe, ocena żywotności oraz morfologii komórek, analiza cyklu oraz śmierci komórek, ocena migracji oraz inwazyjności), biologii molekularnej (oznaczenie poziomu wybranych białek, oznaczanie poziomu wapnia oraz ATP w komórkach). Doktorantka brała również udział w badaniach aktywności *in vivo* badanych związków w Trójmiejskiej Zwierzętni Akademickiej GUMed, oraz analizie statystycznej uzyskanych wyników. W rozdziale 8. brakuje omówienia metodologii badań z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej oraz analizy histochemicznej preparatów pochodzących od zwierząt (uzyskanych w ramach badania *in vivo*). Jednak jak wynika z oświadczeń dołączonych do rozprawy to oznaczenia te wykonane były przez innych uczestników badań, co tłumaczy brak szczegółowego opisu metodyki tych eksperymentów w dysertacji (opis znajduje się natomiast w załączonych artykułach). Warto dodać, że przedstawione w rozprawie doktorskiej badania były finansowane w ramach grantu Harmonia (2019/35/N/NZ2/00505), którego kierownikiem była prof. dr hab. Anna Herman-Antosiewicz; oraz dwóch grantów dla Młodych Naukowców Uniwersytetu Gdańskiego, których kierownik była mgr Mariola Gimła. Zdobywanie finansowania jest bardzo istotnym elementem rozwoju naukowego, a uzyskanie dwóch grantów (choć w wewnętrznych, ale uzyskanych w trybie konkursowym) jest godne uznania.

Na zakończenie chciałbym podkreślić, że **bardzo wysoko oceniam warsztat badawczy Pani mgr Marioli Gimły oraz jej dociekliwość w prowadzeniu badań naukowych.**

d) poprawność układu pracy i struktury podziału treści.

Praca ma klasyczny układ i zawiera: bardzo dokładny spis treści, wykaz prac składających się na rozprawę doktorską, wykaz źródeł finansowania oraz szczegółowy opis stosowanych skrótów. Następnie umieszczono streszczenie w języku polskim i angielskim. Wstęp stanowi dobre i systematyczne wprowadzenie czytelnika w tematykę badań, po którym doktorantka przedstawia cel badań oraz opisuje dokładnie ich metodykę. Warto dodać, że rozwinięciem wprowadzenia jest również praca przeglądowa P(1).

Następnie mgr Gimła omawia szczegółowo poszczególne prace (prace P(1-3)). Samo omówienie zajmuje jedynie 9 stron, ale w mojej opinii jest dobrze przygotowane i wystarczające zarówno, jeśli chodzi o przedstawienie założeń badań, metodyki, wyników oraz najważniejszych wniosków. Następnie doktorantka również krótko, ale i trafnie podsumowuje uzyskane wyniki. Chciałbym podkreślić, że jest to bardzo ważna część rozprawy doktorskiej składającej się z publikacji, która często niestety jest pomijana. Szkoda tylko, że nie jest to dyskusja, a raczej wymienienie najważniejszych dokonań doktorantki. Natomiast cenne jest umieszczone, w tym rozdziale, omówienie ograniczeń pracy oraz potencjalnych sposobów na ich rozwiązanie.

Kolejny rozdział rozprawy zawiera listę cytowanego piśmiennictwa, po czym autorka zamieszcza przedruki publikacji oraz szczegółowe oświadczenia ich współautorów. Lektura oświadczeń jednoznacznie pozwala na określenie wiodącego udziału mgr Gimły w powstaniu tych prac.

Chciałbym podkreślić, że wszystkie sugestie i uwagi zawarte w przedstawionej recenzji, w żadnej mierze nie umniejszają dokonań doktorantki oraz wartości poznawczej prezentowanych wyników. Mam również nadzieję, że praca p(3) zostanie opublikowana do obrony doktoratu.

3) wnioski końcowe.

Podsumowując, rozprawa doktorska Pani mgr Marioli Gimły zawiera bardzo rozbudowaną analizę mechanizmów indukowanych przez kwasu usninowego oraz jego 5 pochodną, przy wykorzystaniu różnorodnych technik oraz modeli komórkowych zarówno w warunkach in vitro jak i in vivo. Warto, podkreślić, że praca skupia się na własnościach nowotworowych badanych związków na modelu komórkowym raka trzustki, którego leczenie mimo wielkiego postępu w ostatnich latach nadal jest niesatysfakcjonujące. W tym kontekście, poszukiwanie nowych metod terapeutycznych jest niezmiernie istotne. **Nie mam, więc wątpliwości, że przedstawiana do recenzji rozprawa doktorska spełnia wszystkie wymagania stawiane rozprawom doktorskim zgodnie z Art. 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz.U. 2018, poz. 1668 z późn. zm.), dlatego też pozwalam sobie przedstawić Wysokiej Radzie Dyscypliny Naukowej Nauk Biologicznych, Uniwersytetu Gdańskiego, wniosek o dopuszczenie Pani mgr Marioli Gimły do dalszych etapów przewodu doktorskiego.**

prof. dr hab. Michał Żmijewski

Katedra i Zakład Histologii
Gdański Uniwersytet Medyczny

Gdańsk, dnia 29.09.2025

Prof. dr hab. Michał Żmijewski