

dr hab. Aleksander Szczurkowski prof. UJK
Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach
Instytut Nauk Medycznych
Zakład Patomorfologii Klinicznej i Doświadczalnej
z Pracownią Histologii i Medycyny Sądowej

Kielce 25.07.2025

RECENZJA

rozprawy doktorskiej Pani mgr Urszuli Bindugi

pt. „Mechanizm działania ekstraktów z czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.) ze szczególnym uwzględnieniem roli substancji polifenolowych i receptora aktywowanego proliferatorami peroksysomów gamma (PPAR γ) w warunkach *in vitro*” wykonanej w Katedrze Biotechnologii i Biologii Komórki, Kolegium Medycznego Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania z siedzibą w Rzeszowie pod kierunkiem prof. dr hab. Konrada Szychowskiego.

Podstawa formalne recenzji:

Zgodnie z uchwałą Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne z dnia 17.06.2025 zostałem powołany na recenzenta w/w rozprawy doktorskiej.

Ogólna charakterystyka rozprawy:

Przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Bindugi stanowi 132 stronicowe opracowanie oraz trzy publikacje naukowe (w tym jedna praca w recenzji). W skład opracowania wchodzi ponadto streszczenia w języku polskim i angielskim oraz składająca się z siedemdziesięciu pozycji bibliografia.

Podstawę rozprawy doktorskiej stanowią następujące publikacje:

1. K. A. Szychowski, **U. E. Binduga**, K. Rybczyńska-Tkaczyk, M. L. Leja, J. Gmiński. Cytotoxic effects of two extracts from garlic (*Allium sativum* L.) cultivars on the human squamous carcinoma cell line SCC-15. Saudi Journal of Biological Sciences, 2018, 25 (8): 1703-1712. (IF2018=2,280; Liczba punktów MNiSW= 25 (100) pkt.*).
2. **U. E. Binduga**, A. Kopeć, J. Skoczylas, K. A. Szychowski. Comparison of the Cytotoxic Mechanisms of Different Garlic (*Allium sativum* L.) Cultivars with the Crucial Involvement of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Gamma. International Journal of Molecular Sciences, 2025, 26 (1): 387. (IF2023=4,900; Liczba punktów MNiSW=140 pkt.).
3. **U. E. Binduga**, K. A. Szychowski, Current state of knowledge on the anticancer properties of polyphenolic compounds from garlic (*Allium sativum* L.) - **publikacja w recenzji**.

Sumaryczna wartość IF prac składających się na rozprawę doktorską: **7,180**.

Właściwości spożywcze jak i lecznicze czosnku doceniane były już w starożytności, a pierwsze wzmianki o jego zaletach można znaleźć w egipskim manuskrypcie tzw. „Codex Ebers” datowanym na rok 1550 p.n.e. Zaleca się tu stosowanie tej rośliny jako środek przeciwbólowy czy lek na ukąszenia owadów. Podobnie w starożytnej Grecji był on tradycyjnie stosowany w leczeniu różnych zaburzeń, w tym trądu, biegunki, zaparć, astmy, gorączki czy infekcji. W czosnku można zidentyfikować nie tylko fosfor, potas, magnez, sód czy wapń ale również selen czy german, których ilość zależy od ich obecności w glebie. Czosnek jest bogaty w witaminę C oraz witaminy z grupy B (szczególnie B1). Ponadto czosnek zawiera dużą liczbę (zidentyfikowano ponad 200) substancji biologicznie czynnych o różnych właściwościach. Przeprowadzone w ostatnich latach badania naukowe wykazały, że czosnek posiada właściwości przeciwhiperlipidemiczne, przeciwutleniające, przeciwzapalne, wspomagające układ krążenia, przeciwbakteryjne, przeciwwirusowe, przeciwgrzybicze, przeciw pasożytnicze oraz przeciwnowotworowe.

Biologicznie aktywne związki czosnku dzieli się na dwie grupy: substancje zawierające siarkę oraz substancje nie zawierające siarki. Czosnek zawiera najwyższe stężenie związków siarkowych (allin, dwu i trójsiarczek diallilu, ajoen, czy S-allilocysteina) spośród wszystkich gatunków rodzaju *Allium sp.* stąd też związki te są najczęściej badanymi i w konsekwencji uznanymi za odpowiedzialne za jego właściwości prozdrowotne. Drugą grupę substancji stanowią związki wolne od siarki, a wśród często niedoceniane są polifenole, które jak wskazują badania posiadają nawet silniejsze właściwości prozdrowotne niż związki zawierające siarkę. Dzięki wysokiej zawartości polifenoli i naturalnych przeciwutleniaczy (np. witamina C), czosnek może bezpośrednio i pośrednio zwiększać ekspresję enzymów antyoksydacyjnych, chroniąc prawidłowe komórki przed stresem oksydacyjnym.

Reaktywne formy tlenu (ROS, ang. *reactive oxygen species*) należą do naturalnych, ubocznych produktów metabolizmu, a nadmiar ich szczególnie ze źródeł zewnętrznych, prowadzi do zaburzeń homeostazy, uszkodzeń DNA, białek i lipidów, a w konsekwencji do apoptozy. Wykazano, że ekstrakty z czosnku zawierają aktywne składniki wykazujące zdolność do neutralizacji ROS, zwiększania poziomu glutationu i stymulowania ekspresji enzymów antyoksydacyjnych w zdrowych komórkach. Niewielka stymulacja ROS jest korzystna dla komórek prawidłowych natomiast komórki nowotworowe ze względu na ich wysoki metabolizm i zaburzenia mitochondrialne, są szczególnie wrażliwe na dodatkowy stres oksydacyjny. Przeprowadzone w ostatnich latach badania wskazują, że ekstrakty z czosnku mogą wywoływać apoptozę w liniach komórkowych raka wątroby (HepG2), jelita grubego (CACO-2), prostaty (PC-3) i piersi (MCF-7) poprzez aktywację kaspazy-3 - enzymu kluczowego dla szlaku apoptozy. Ponadto czosnek może indukować śmierć komórek niezależnie od kaspazy, np. za pośrednictwem allicyny czy kwasu galusowego.

Jednym z interesujących kierunków badań jest rola receptora aktywowanego przez proliferatory peroksysomów gamma (PPAR γ , ang. *peroxisome proliferator-activated receptor*

gamma), który reguluje różnicowanie komórek, metabolizm, autofagię oraz produkcję enzymów antyoksydacyjnych. Z kolei polifenole obecne w czosnku zwyczajnym, takie jak kwercetyna, kwas kawowy i kwas ferulowy, mogą aktywować receptor PPAR γ , modulując jego aktywność transkrypcyjną dzięki czemu czosnek może wywierać działanie przeciwzapalne i wpływać na metabolizm poprzez mechanizmy zależne od PPAR γ .

W przeprowadzonych przez Doktorantkę badaniach wykorzystano trzy linie komórkowe. Dwie z nich to linie nowotworowe: gruczolakorak okrężnicy (CACO-2), oraz płaskonabłonkowy rak języka (SCC-15). Natomiast trzecia linia, linia fibroblastów (BJ) wykorzystana została do oceny toksycznego wpływu związków aktywnych zawartych w czosnku na komórki prawidłowe.

W pierwszej publikacji poddano analizie cytotoksyczność wodnych ekstraktów dwóch odmian czosnku zwyczajnego - polskiej odmiany Harnaś oraz hiszpańskiej odmiany Morado w komórkach ludzkiej linii raka płaskonabłonkowego języka SCC-15. Głównym celem badania było określenie udziału ROS oraz procesu apoptozy w mechanizmie działania cytotoksycznego wspomnianych ekstraktów czosnkowych. Przeprowadzone badania wykazały, że oba ekstrakty czosnkowe indukują znaczący wzrost poziomu ROS w komórkach SCC-15 już po 6 godzinach inkubacji, przy czym efekt ten był bardziej intensywny i długotrwały w przypadku odmiany Harnaś. Podobny wynik uzyskano po 24 i 48 godzinach co wskazuje na to, że komórki nowotworowe charakteryzują się wyższym poziomem endogennego stresu oksydacyjnego i to czyni je szczególnie podatnymi na dalszy wzrost ROS wywołany przez czynniki egzogenne. Co ciekawe ekstrakty czosnkowe nie aktywowały znacząco kaspazy-3 (głównego enzymu efektorowego szlaku apoptozy) nawet po 48 godzinach hodowli. Wyjątkiem był nieznaczny wzrost aktywności kaspazy-3 po zastosowaniu niskiego stężenia ekstraktu Morado. Co więcej, najwyższe stężenia obu ekstraktów obniżały aktywność tego enzymu. Sugeruje to, że dominującym mechanizmem śmierci komórkowej może być nekroza lub mniej

prawdopodobnie alternatywne formy śmierci komórek, takie jak ferroptoza czy kaspazozależna apoptoza. Istotnym aspektem opisywanej publikacji było zbadanie udziału ROS w procesie cytotoksyczności. Doświadczenia przeprowadzone z wykorzystaniem N-acetylo-L-cysteiny (NAC), będącej skutecznym zmiataczem wolnych rodników, wykazały wyraźne zahamowanie produkcji ROS oraz co za tym idzie ochronę komórek przed działaniem ekstraktów czosnkowych. Wyniki te jednoznacznie potwierdzają, że czosnek i jego składniki wywierają efekt przeciwnowotworowy poprzez indukcję stresu oksydacyjnego, uszkodzeń DNA oraz zakłócenia w integralności błon komórkowych.

W drugiej publikacji dokonano porównawczej analizy czterech odmian czosnku, w tym dwóch pochodzących z Polski (Harnaś, Ornak) oraz dwóch z Hiszpani (Violeta i Morado) pod kątem ich właściwości przeciwnowotworowych w warunkach *in vitro*. Badania przeprowadzono, podobnie jak w publikacji pierwszej na dwóch liniach komórek nowotworowych: SCC-15 i CACO-2, a także na prawidłowych fibroblastach linii BJ. Celem badań było określenie toksyczności i działania proapoptotycznego ekstraktów uzyskanych z liofilizatów czosnków, jak również przeanalizowanie zależności pomiędzy zawartością polifenoli a działaniem antynowotworowym danego ekstraktu oraz określenie zmian ekspresji receptora PPAR γ po ekspozycji na badane ekstrakty. Z przeprowadzonych doświadczeń wynika, że wszystkie badane ekstrakty wykazywały zdolność do generowania ROS, a efekt ten był wyraźnie silniejszy w liniach komórek nowotworowych niż w fibroblastach. Największy wzrost poziomu ROS odnotowano dla odmiany Harnaś w komórkach CACO-2 - ponad 15-krotny względem kontroli. W omawianej publikacji analizowany był też profil polifenolowy ekstraktów. Badania wykazały obecność wielu bioaktywnych związków o znanym potencjale przeciwnowotworowym. Ekstrakty Harnaś i Ornak zawierały najwięcej katechiny - związku będącego agonistą PPAR γ - co może tłumaczyć ich zdolność do modulacji szlaków sygnałowych zależnych od tego receptora. Odmiana Violeta wyróżniała się obecnością

acacetyny, epikatechiny i naryngeniny, a Morado był bogaty w kemferol i rutynę - flawonoidy o udowodnionym działaniu cytotoksycznym i proapoptotycznym w różnych typach nowotworów. Interesującą obserwacją była najwyższą zawartość polifenoli u odmiany Morado przy najniższej aktywności antyoksydacyjnej. Ta obserwacja sugeruje, że polifenole nie są głównym składnikiem odpowiedzialnym za właściwości antyoksydacyjne czosnku. Reasumując: największy potencjał przeciwnowotworowy wykazały odmiany Harnaś i Ornak, charakteryzujące się wysoką aktywnością prooksydacyjną, zdolnością do zmian ekspresji PPAR γ oraz selektywnością względem komórek nowotworowych. Odmiana Morado, pomimo silnego działania cytotoksycznego, wykazywała niższą selektywność, natomiast Violeta okazała się najłagodniejsza.

Celem trzeciego opracowania była analiza dostępnej literatury naukowej dotyczącej zawartości polifenoli w ekstraktach pochodzących z różnych form czosnku oraz przedstawienie antynowotworowego mechanizmu działania czosnkowych polifenoli w warunkach *in vitro*. W pracy sklasyfikowano polifenole występujące w czosnku do czterech głównych grup: flawonoidy (np. kwercetyna, katechina, naryngenina), kwasy fenolowe (np. kwas galusowy, ferulowy, kawowy), stilbeny (np. resweratrol) oraz lignany (np. matairezynol). Zawartość oraz skład jakościowy tych związków zależy od wielu czynników, w tym odmiany czosnku, etapu dojrzałości, sposobu obróbki (czosnek surowy, suszony, czarny), jak również od warunków środowiskowych. Podkreślono, że liście czosnku zawierają znacznie więcej polifenoli niż ząbki, co czyni je obiecującym surowcem farmaceutycznym. Publikacja jest cenną analizą mechanizmów działania konkretnych związków polifenolowych obecnych w czosnku z uwzględnieniem szczegółowych szlaków sygnałowych. Postulowana jest również konieczność opracowania preparatów czosnkowych standaryzowanych pod kątem zawartości polifenoli, co może zwiększyć skuteczność i bezpieczeństwo preparatów czosnkowych. Praca również wskazuje na potrzebę przeprowadzenia badań na modelach *in vivo*, a w dalszej perspektywie

badan klinicznych, które udowodniły by zasadność zastosowania preparatów czosnku w terapii przeciwnowotworowej.

Cała rozprawa doktorska złożona z trzech publikacji logicznie przedstawia badania *in vitro* na linii komórkowej SCC-15 pod kątem udziału ROS i aktywacji kaspazy-3 w wysokich stężeniach świeżych ekstraktów czosnku, porównanie działania czterech odmian przy wykorzystaniu ekstraktów pochodzących z liofilizatów z profilem polifenoli i analizą receptora PPAR γ oraz parametrów stresu oksydacyjnego i mechanizmu śmierci komórek (analizy LC3A/SOD1/CAT) w komórkach linii nowotworowych SCC-15 i CACO-2 oraz komórkach prawidłowych linii fibroblastów BJ. Rozprawę zamyka przegląd dotyczący polifenoli czosnku w kontekście mechanizmów przeciwnowotworowych.

Konstrukcja rozprawy jest spójna tematycznie i metodycznie jednak w kilku miejscach brak jest pewnego uściślenia i interpretacji roli receptorów PPAR γ w mechanizmie działania składników czosnku. Mimo wykazanego w doświadczeniach pod wpływem ekstraktów czosnku spadku ekspresji białka lub/i mRNA dla PPAR γ nie można z całą pewnością twierdzić, że dowodzi to aktywacji receptora. Być może w przyszłości należałoby rozważyć wykonanie testu PPRE-luc, lub/i zastosować w doświadczeniach farmakologiczną modulację z wykorzystaniem agonisty/antagonisty PPAR γ jak np. rosiglitazonu czy GW9662. Ewentualnie można by posłużyć się metodą knock-down, czyli inaczej metodą wyciszenia receptora przy pomocy siRNA oraz przeprowadzić analizę translokacji aktywowanego receptora z cytoplazmy do jądra. To pozwoli odróżnić wtórną regulację aktywacji od przyczynowej. Zwłaszcza, że Doktorantka sama przyznaje we wnioskach w Publikacji 2, że udział PPAR γ w mechanizmie działania polifenoli nie został jednoznacznie rozstrzygnięty.

Z kolei w Publikacji 1, w której nie udało się wykazać wzrostu aktywności kaspazy-3 można by w przyszłości rozszerzyć panel metod badania procesu apoptozy o zanalizowanie ekspresji PARP, zbadanie aktywności i ekspresji białka kaspazy-8 oraz kaspazy-9, a także

zbadać końcowy etap apoptozy, czyli fragmentację DNA i obecność ciałek apoptotycznych. Może istotnym byłoby również określenie czy składniki czosnku uruchamiają inne mechanizmy śmierci komórkowej stosując markery ferroptozy (GPX4, lipid-ROS), nekroptozy (p-MLKL), oraz autofagii (LC3B-II/I, p62). To mocniej uwiarygodni wniosek, że mamy do czynienia z apoptozą niezależną od kaspaz czy z alternatywną formą śmierci komórkowej.

Mocną stroną rozprawy są na pewno wyniki uzyskane przy wykorzystaniu metody HPLC dla polifenoli. Brakuje jednak równoległej ilościowej charakterystyki związków siarkowych (allicyna/ajoen/DADS), zwłaszcza w ekstraktach świeżych vs. z liofilizatów. Proszę rozważyć w przyszłości wykorzystanie chromatografii cieczerw sprężonej ze spektrometrią mas, ponieważ jest to technika analityczna, która łączy rozdzielczość chromatografii cieczerw z możliwościami spektrometrii mas, umożliwiając identyfikację oraz ilościowe oznaczanie związków chemicznych w próbkach (LC-MS).

Z obowiązku należy wspomnieć, że w polskim opracowaniu popełnione zostały pojedyncze literówki jak np. „katalazy” (powinno być katalazy); „wykożystująca” (powinno być wykorzystująca). Oczywiście wszystkie powyższe uwagi nie wpływają na wysoką ocenę rozprawy doktorskiej pani mgr Urszuli Bindugi.

Moje wszystkie uwagi mają charakter drugoplanowy i nie rzutują na merytoryczną ocenę pracy, natomiast biorąc je pod uwagę nasuwają się następujące pytania:

1. Czy, a jeśli tak to jakie dodatkowe eksperymenty funkcjonalne planuje Pani, aby potwierdzić, że receptor PPAR γ pośredniczy w obserwowanych efektach składników czosnku?
2. Jakie widzi Pani interakcje ekstraktów czosnku z chemioterapeutykami (synergia/antagonizm) oraz czy widzi Pani jakieś potencjalne zastosowanie suplementacji/ekstraktów czosnkowych w procedurach leczniczych?

Na zakończenie należy jeszcze podkreślić, że realizacja doświadczeń wymagała od Doktorantki użycia szeregu trudnych technik laboratoryjnych stosowanych w biologii molekularnej takich jak izolacja RNA, reakcja odwrotnej transkrypcji (RT), łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym czy metoda Western blot. Ponadto Doktorantka z powodzeniem posługiwała się szeregiem metod biochemicznych, immunohistochemicznych i immunofluorescencyjnych oraz trudną techniką hodowli komórek *in vitro*.

Podsumowując stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Bindugi pt. „Mechanizm działania ekstraktów z czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.) ze szczególnym uwzględnieniem roli substancji polifenolowych i receptora aktywowanego proliferatorami peroksysomów gamma (PPAR γ) w warunkach *in vitro*” stanowi oryginalne opracowanie problemu naukowego, wnosi istotne elementy do nauki i spełnia wszystkie warunki stawiane rozprawie doktorskiej zgodnie z art. 187 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2023 poz. 742, z późn. zm.).

Wnioskuje do Rady Naukowej Dyscypliny Nauki Medyczne Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania w Rzeszowie o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Bindugi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Aleksander Szczurkowski



Kielce 25.07.2025



Uniwersytet Jana Kochanowskiego w Kielcach