

Dr hab. inż. Tomasz Piechowiak, profesor uczelni
Katedra Chemii i Toksykologii Żywności
Wydział Technologiczno-Przyrodniczy
Uniwersytet Rzeszowski
Ul. Ćwiklińskiej 1A, 35-601 Rzeszów

RECENZJA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

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*”

mgr Urszuli Bindugi

Informacje dotyczące rozprawy doktorskiej oraz sylwetki naukowej Doktorantki

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska mgr Urszuli Bindugi powstała pod opieką prof. dr hab. Konrada Szychowskiego w Kolegium Medycznym Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania z siedzibą w Rzeszowie.

Rozprawę doktorską stanowi cykl powiązanych ze sobą tematycznie trzech prac naukowych, spośród których dwie zostały opublikowane w czasopismach naukowych o zasięgu międzynarodowym tj. *Saudi Journal of Biological Sciences* oraz *International Journal of Molecular Sciences* o łącznym IF = 7.18 (MNiSW = 240 pkt). Kolejną pracą Doktorantki jest manuskrypt przedstawiający przegląd literatury, który został złożony do czasopisma (*Journal of Traditional and Complementary Medicine*, IF = 3.0) i przeszedł pierwszy etap recenzji, lecz nie został jeszcze opublikowany. Zgodnie z oświadczeniami złożonymi przez Autorów, Doktorantka pełniła wiodącą rolę w powstaniu powyższych prac, a jej udział obejmował m.in. przeprowadzenie większości analiz biochemicznych i molekularnych (praca 1 i 2), przygotowanie i poprawę manuskryptów (praca 2 i 3), a także występowanie w roli autora korespondencyjnego (praca 2 i 3). Nawiązując do określonych udziałów p. Urszuli w powyższych pracach nasuwa się pytanie, dlaczego Doktorantka nie jest pierwszym autorem w publikacji 1, skoro udział współautorstwa został określony na 60% ?

Artykuły stanowiące podstawę rozprawy zostały omówione w 16-stronicowym opracowaniu zatytułowanym „Podsumowanie i wnioski”, o poprawnej i typowej kolejności podrozdziałów, obejmujących: „Wprowadzenie i uzasadnienie wyboru tematu”, „Omówienie publikacji stanowiących cykl” oraz „Syntetyczne podsumowanie”. Ostatni podrozdział opracowania „Ograniczenia rozprawy” uważam za zbędny. Z jednej strony pokazuje zdolność Doktorantki do krytycznej oceny własnych badań i potrzeby ich rozwijania dla lepszego zrozumienia dokonanych odkryć, lecz z drugiej, osłabia odbiór rozprawy i może dać czytelnikowi pretekst do uznania, że badania zostały niedostatecznie zaplanowane. Pozostałą część rozprawy tworzą: „Wykaz stosowanych skrótów”, „Analiza bibliometryczna cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską”, „Publikacje wchodzące w skład cyklu prac”, „Bibliografia”, „Streszczenie w języku polskim”, „Streszczenie w języku angielskim”, „Opinia

komisji bioetycznej”, „Oświadczenia autorów publikacji” oraz „Całościowy dorobek kandydata”.

Styl pisania rozprawy cechuje się jasnością, dużą przystępnością dla szerokiego grona odbiorców oraz spójnym układem myśli. Jednak zdarzają się w niej nieliczne błędy stylistyczne, skróty myślowe, kalki językowe, błędy ortograficzne i kolokwializmy. Na przykład: (i) na stronie 4, skrót „H₂DCF-DA” rozwinięto jako „dichlorodihydrofluoresceina diacetat” a powinno być: „dioctan dichlorodihydrofluoresceiny”; (ii) w zdaniu ze strony 110 „Mimo niezbędnej roli ROS w fizjologii komórki, ich nadmiar ze źródeł zewnętrznych, prowadzi do zaburzeń...” Sformułowanie „ze źródeł zewnętrznych” jest znacznym uproszczeniem i właściwie niepoprawne, gdyż wspomniane „źródła zewnętrzne” przypuszczalnie odnoszą się do czynników indukujących wytwarzanie ROS w organizmie, a to powinno być doprecyzowane; (iii) w tytule tabeli 1 „W przypadku chromatograficznej jednokierunkowej analizy wariancji (ANOVA)...” użycie słowa „chromatograficznej” jest nielogiczne. Uważam również, że opis obserwacji dokonanych przez Doktorantkę zyskałby na odbiorze, gdyby umieściła w nim najważniejsze wyniki badań w postaci wykresów, rysunków lub schematów przedstawiających wyjaśniane mechanizmy.

Wprawdzie w pracy pojawiają się pewne niedoskonałości edytorskie, nie umniejszają one wartości merytorycznej artykułów stanowiących podstawę dzieła. Prezentują one wartościowe i oryginalne wyniki badań oraz trafne wnioski naukowe o istotnym potencjale aplikacyjnym.

Ocena merytoryczna rozprawy

W ostatnich latach, opublikowano wiele badań, prowadzonych zarówno w warunkach *in vitro* jak i *in vivo*, które potwierdzają istotną rolę spożywania *Allium sativum* L. w prewencji chorób dieto-zależnych. Udowodniono, że stanowiące główną frakcję aktywną organiczne związki siarki, szczególnie pochodne allicyny, wykazują szerokie spektrum oddziaływań biologicznych - od przeciwdrobnoustrojowych, przeciwzapalnych, przez antyoksydacyjne, wspierające układ krążenia, po silne właściwości przeciwnowotworowe. Jednak pod kątem właściwości przeciwnowotworowych, frakcja polifenolowa czosnku została przebadana w ograniczonym stopniu, co prawdopodobnie stało się impulsem do rozwinięcia tego zagadnienia przez Doktorantkę. Uważam, zatem że temat badań podjęty przez p. Urszulę jest trafny i wpisuje się w aktualny trend badawczy dotyczący poszukiwania źródeł substancji aktywnych, które mogą być wykorzystane jako składniki suplementów diety lub żywności funkcjonalnej.

Głównym celem podjętych badań było określenie potencjału antynowotworowego wodnych ekstraktów z czosnku. Z kolei zakres prac badawczych obejmował: (i) otrzymanie preparatu zawierającego związki bioaktywne z czosnku, różnych odmian, zarówno świeżego jak i liofilizowanego; (ii) potwierdzenie właściwości antynowotworowych ekstraktów wobec linii komórkowej raka płaskonabłonkowego języka (SCC-15) oraz linii komórkowej ludzkiego gruczolaka jelita grubego (CACO-2) wraz z próbą wyjaśnienia mechanizmu cytotoksycznego; (iii) sprawdzenie toksyczności ekstraktów w stosunku do ludzkich komórek (normalnych) fibroblastów (BJ). Cel pracy

został przez Doktorantkę w większości osiągnięty. Uzyskane wyniki badań, wraz z ich dyskusją zostały przedstawione w pracach eksperymentalnych:

(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

(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.

W pierwszej pracy eksperymentalnej Doktorantka badała właściwości przeciwnowotworowe wodnych ekstraktów z czosnku świeżego odmiany Harnaś oraz Morado w stosunku do komórek SCC-15. Aby odpowiedzieć na postawione pytanie badawcze, p. Urszula wykorzystała techniki często stosowane w badaniu biologii komórki, tj. fluorymetryczny pomiar reaktywnych form tlenu (test z H₂DCF-DA), kolorymetryczne analizy żywotności komórek (uwalnianie LDH, pomiar z czerwienią obojętną) oraz aktywności kaspazy-3, mikroskopowa analiza ciałek apoptotycznych (Hoechst 33342, kalceina AM). Autorka udowodniła, że ekstrakty otrzymane ze wspomnianych odmian czosnku wykazywały silną aktywność cytotoksyczną która była spowodowana nagromadzeniem się RFT w komórkach. Wygenerowanie stresu oksydacyjnego przez ekstrakty powodowało uszkodzenia błon komórkowych, a to skutkowało kaspazozależną (przypuszczalnie) śmiercią komórki.

W eksperymencie przedstawionym w drugiej publikacji, Autorka oceniała właściwości przeciwnowotworowe wodnych ekstraktów czosnku, które były pozyskane z materiału liofilizowanego (odmiany Harnaś, Ornak, Violeta, Morado) w stosunku do komórek SCC-15 i CACO-2. Dodatkowo, Doktorantka sprawdziła, czy pozyskane ekstrakty wykazują toksyczność w stosunku do komórek prawidłowych (fibroblastów ludzkich/BJ). Autorka zastosowała bardzo podobną metodologię badań biologicznych i biochemicznych jak w pracy pierwszej, lecz w celu dodatkowego potwierdzenia indukcji stresu oksydacyjnego i oceny roli receptora PPAR γ w regulacji apoptozy, włączyła do swojego warsztatu technikę RT-qPCR oraz ELISA do badania białek SOD1, CAT, PPAR γ , LC3A, na poziomie odpowiednio transkryptomu i proteomu. Ponadto, uzupełniła badania biologiczne o analizę chromatograficzną (HPLC-DAD) wybranych polifenoli zawartych w ekstraktach. Dowiodła tym samym, że ekstrakty wodne z czosnku powodują wyraźne zwiększenie wytwarzania RFT w testowanych liniach komórek nowotworowych, przy nieznacznej generacji RFT w komórkach prawidłowych. Jednak istotne zmniejszenie aktywności metabolicznej (test Alamar-Blue) odnotowane było w przypadku wszystkich testowanych ekstraktów w stosunku do SCC-15, natomiast w przypadku CACO-2, cytotoksyczny okazał się tylko Harnaś i Morado w stężeniu 1 mg/ml. Autorka zaobserwowała, że zaangażowanie receptora PPAR γ , jak również białek LC3A (marker autofagii), SOD1 i CAT w kształtowaniu cytotoksyczności ekstraktów z czosnku było uzależnione od odmiany czosnku (składu ekstraktu) jak i typowej dla linii komórkowej odporności na stres oksydacyjny. Nie mniej, Autorka odkryła, że ekstrakty z czosnku

(odmiany Harnaś i Ornak), które były bogate w katechinę najsilniej zmniejszały ekspresję mRNA PPAR γ , potwierdzając rolę tego receptora w modulacji zależnych od niego szlaków sygnałowych.

Mocną stroną dysertacji jest część eksperymentalna poświęcona badaniom biologicznym otrzymanego ekstraktu. Doktorantka, pod opieką Promotora umiejętnie połączyła w nich różnorodne techniki biologii molekularnej i analizy biochemicznej, co umożliwiło uzyskanie spójnych, wieloaspektowych wyników i wniosków odpowiadających na postawione pytanie badawcze. Dogłębne zrozumienie zasad każdej z zastosowanych metod z pewnością będzie cennym atutem w jej dalszej pracy naukowej. Jednak koncepcja i organizacja doświadczeń, rodzi poniższe pytania, które wymagają uzyskania od Doktorantki odpowiedzi:

1. Dlaczego wykorzystano do badań odmiany Harnaś, Ornak, Violeta i Morado? Czy było to związane z ich popularnością na rynku lub zróżnicowanym składem chemicznym?

2. Doktorantka w swojej pracy kładzie nacisk na badanie właściwości przeciwnowotworowych frakcji polifenolowej pochodzącej z czosnku (jako modulatorów PPAR γ). Uważam, że podejście do preparatyki, które zaproponowano w rozprawie jest niewystarczające. Wydajność odzysku i profil polifenoli z roślin uzależniony jest od warunków ekstrakcji, głównie polarności ekstrahenta. Ponieważ polifenole cechuje zróżnicowana rozpuszczalność – szczególnie cecha ta dotyczy flawonoidów – dlatego zatem w powyższych badaniach wykorzystano wodę jako rozpuszczalnik polifenoli? Wiele podobnych doniesień pokazuje, że największą wydajność polifenoli uzyskuje się stosując rozpuszczalniki wodno-alkoholowe (np. wodno-etanolowe), a nie wodne. Poza tym, ekstrakty wodne wytworzone ze świeżego lub liofilizowanego surowca nadal wykazują aktywność enzymatyczną, a ponieważ tkanka roślinna zawiera m.in. enzymy metabolizujące polifenole (np. oksydazę polifenolową), ekstrakcja wodą o temperaturze pokojowej może sprzyjać degradacji polifenoli, zaniżać ich ogólną wydajność i zmieniać ich profil w odniesieniu do nienaruszonej tkanki. Wobec powyższego uważam, że brak przeprowadzonego doświadczenia optymalizacyjnego, chociażby z użyciem metody powierzchni odpowiedzi (RSM) lub nawet prostego screeningu polegającego na zmierzeniu odzysku polifenoli w ekstraktach z czosnku wytworzonych za pomocą etanolu o różnych stężeniach, jest podstawową wadą tej rozprawy.

3. Wprawdzie główną grupą związków bioaktywnych w surowych ekstraktach wodnych będą przypuszczalnie polifenole, to jednak pozostałą frakcją będą stanowiły substancje, które mogą zmieniać kierunek oddziaływania biologicznego ekstraktu, chociażby związki siarkowe, wolne aminokwasy, kwas askorbinowy lub cukry. Uważam zatem, że Doktorantka powinna wykonać bardziej szczegółową charakterystykę profilu fitochemicznego ekstraktu (szczególnie organicznych związków siarki) aby lepiej wyjaśnić zachodzące zmiany i/lub przeprowadzić frakcjonowanie ekstraktu i oczyścić pożądaną grupę związków na sorbentach. Nawet badania porównujące aktywność przeciwnowotworową frakcji olejowej, ekstraktu wodnego, alkoholowego, acetonowego itp. mogłoby wzbogacić niniejszą rozprawę i wnieść solidną porcję wiedzy do literatury tematu.

4. Dlaczego w drugiej publikacji wykorzystano materiał liofilizowany, a w pierwszej materiał świeży? Liofilizacja w porównaniu z innymi technikami odwadniania najlepiej zachowuje fitochemikalia tkanki (w tym jej aktywność biologiczną) i często jest stosowana jako etap przygotowania materiału roślinnego do ekstrakcji. Ponieważ, zarówno podczas przygotowania ekstraktu do artykułu 1 i 2 wykorzystano 10 g materiału (liofilizowanego lub świeżego) i 100 ml rozpuszczalnika (wody lub PBSu), sądzę, że obydwa „rodzaje” ekstraktów różnią się bardziej ostateczną koncentracją składników suchej masy, w tym fitochemikaliów, a niekoniecznie składem jakościowym tych związków. Liofilizacji nie należy więc postrzegać jako metody utrwalania surowców prowadzącej do degradacji fitozwiązków, co ma miejsce w przypadku np. suszenia próżniowego lub konwekcyjnego, w których stosuje się podwyższoną temperaturę.

5. Proszę o doprecyzowanie, jak uzyskiwano stężenia 0.062 – 1.000 mg/ml w hodowli komórkowej? Czy po ekstrakcji, preparat został zliofilizowany, następnie sporządzono z niego rozwór wyjściowy o znanym stężeniu, który rozcieńczano i dodawano do hodowli? Czy standaryzowano stężenia ekstraktów dodawanych do hodowli w oparciu o znajomość suchej masy w ekstrakcie?

6. Dlaczego ekspresję mRNA jak i ekspresję białek (ELISA) w tym antyoksydacyjnych, mierzono po 6 godzinach, skoro poziom RFT był mierzony dopiero po 24 godzinach? Czy dla potwierdzenia i wyjaśniania zmian w aktywności mechanizmów zależnych od RFT nie należałoby mierzyć wszystkich parametrów w tym samym punkcie czasowym lub kilku punktach czasowych razem?

7. Doktorantka w tekście opracowania pisze, że: *„Co ciekawe najwyższą zawartość polifenoli miała odmiana Morado (848,84 mg/100g) przy najniższej aktywności antyoksydacyjnej (42,28 μ mol Troloxu/1g). Ta obserwacja sugeruje, że polifenole nie są głównym składnikiem odpowiedzialnym za właściwości antyoksydacyjne czosnku. Zgodnie z literaturą oprócz polifenoli za silne właściwości antyoksydacyjne czosnku odpowiedzialne są selen, witamina C oraz liczne związki siarkowe które nie były badane w niniejszej rozprawie”*. Obserwacja ta została nieprawidłowo zinterpretowana. Obecność dodatkowych antyoksydantów np. askorbinianu, glutationu lub innych związków siarko-organicznych wzmacnia zdolność ekstraktu do neutralizacji ABTS^{•+}, wobec czego ostateczna aktywność antyoksydacyjna powinna być najwyższa lub porównywalna z innymi odmianami. Poza tym, uważam, że tabela 1 umieszczona na końcu podsumowania publikacji 2 nie wiele wnosi do opracowania, choć mogłaby zostać włączona do artykułu 2, jako charakterystyka ekstraktu np. w rozdziale „*Materials and Methods*”.

Na tym etapie pragnę podkreślić, że zgłoszone uwagi dotyczą kwestii metodologicznych, które mogłyby zostać doprecyzowane w pracy, jednak nie wpływają w znaczny sposób na jej odbiór ani na wartość merytoryczną. Praca mimo to pozostaje spójna i logiczna, a przedstawione wyniki zachowują swoją wiarygodność oraz znaczenie. Uwagi te należy traktować przede wszystkim jako sugestie na przyszłość, które mogą okazać się pomocne, jeśli Doktorantka zechce prowadzić podobne badania w dalszej karierze naukowej.

Ostatnim artykułem, który zamyka całą dysertację jest praca przeglądowa:

(3) U. E. Binduga, K. A. Szychowski. *Current state of knowledge on the anticancer properties of polyphenolic compounds from garlic (Allium sativum L.)*.

Przedstawiony manuskrypt przeszedł już pierwszy etap recenzji, dokonano w nim poprawek zgodnie z uwagami recenzenta i ponownie, w zmienionej formie został złożony do *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. W artykule tym, Doktorantka przedstawia opis dotychczasowych doniesień naukowych dotyczących przeciwnowotworowych właściwości polifenoli pochodzących z czosnku. Artykuł podzielony jest na sześć rozdziałów, w których Autorka m.in. dokonuje klasyfikacji związków polifenolowych obecnych w czosnku, opisuje ogólny mechanizm oddziaływania polifenoli z czosnku, kładąc nacisk na rolę receptora PPAR γ , a także szczegółowo omawia mechanizm przeciwnowotworowy poszczególnych (głównych) polifenoli obecnych w czosnku, tj. kwercetyny, kwasu kawowego, kwasu ferulowego, kwasu *p*-kumarowego, kemferolu i kwasu galusowego. Praca ta stanowi rzetelny i wartościowy przegląd z wyraźnym wkładem oryginalnym w postaci pogłębionej analizy mechanizmów polifenoli pochodzących z czosnku. W trakcie lektury znalazłem istotny błąd, który powinien zostać zmieniony w manuskrypcie:

8. W tabeli 2 i 3 przedstawione są odpowiednio: zawartość oraz oddziaływanie biologiczne izotiocyjanianu allilu w stosunku do GMB8401 i MCF-7. Przykład ten powinien zostać usunięty z tabel, ponieważ tabele dotyczą zidentyfikowanych w czosnku polifenoli, a izotiocyjanian allilu nie należy do tej grupy substancji.

Podsumowanie oraz wnioski końcowe

Przedstawiona do oceny praca doktorska stanowi oryginalne i wartościowe opracowanie naukowe, które poszerza krajową i międzynarodową wiedzę w zakresie poszukiwania naturalnych źródeł substancji o potencjalnych właściwościach przeciwnowotworowych. Pomimo zgłoszonych uwag uważam, że badania przeprowadzone przez Doktorantkę mają wysoką wartość poznawczą i wnoszą oryginalny wkład w rozwój nauk medycznych.

W świetle powyższego stwierdzam, że przedstawiona do recenzji rozprawa doktorska mgr Urszuli Bindugi pt. „*Mechanizm działania ekstraktów z czosnku zwyczajnego (Allium sativum L.) ze szczególnym uwzględnieniem roli substancji polifenolowych i receptora aktywowanego proliferatorami peroksydomów gamma (PPAR γ) w warunkach in vitro*” spełnia wszystkie wymagania formalne przedstawione w artykule 187 Ustawy z dnia 20 lipca 2018 r. Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce (Dz. U. z 2023 r. poz. 742 z późn. zm.). Wnioskuje zatem o dopuszczenie mgr Urszuli Bindugi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Rzeszów, 11.08.2025 r.

