

dr hab. n. med. Anna Grenda

Pracownia Immunologii i Genetyki

Katedry i Kliniki Pneumonologii, Onkologii i Alergologii

Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Urszuli Bindugi

Rozprawa doktorska stanowiąca cykl publikacji pt. 'Mechanizm działania ekstraktów z czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.) ze szczególnym uwzględnieniem roli substancji polifenolowych i receptora aktywowanego proliferatorami peroksosomów gamma (PPAR γ) w warunkach *in vitro*'

Promotorem rozprawy jest Pan prof. dr hab. Konrad Szychowski.

Na Rozprawę doktorską składają się dwa artykuły naukowe opublikowane w czasopiśmie z listy JCR oraz artykuł przygotowany i wysłany do redakcji czasopisma *Journal of Traditional and Complementary Medicine*. Sumaryczny wskaźnik IF prac z cyklu (bez uwzględnienia pracy przeglądowej będącej w recenzji) wynosi 7,180, natomiast sumaryczna liczba punktów MNISW prac (bez uwzględnienia pracy przeglądowej będącej w recenzji) składających się na rozprawę doktorską wynosi 165. Autorka w swojej rozprawie podaje liczbę punktów oraz wartość wskaźnika IF dla prac stanowiących podstawę rozprawy doktorskiej, natomiast nie ma podsumowania punktowego oraz wskaźnika IF w odniesieniu do dorobku całkowitego. Formalna analiza bibliometryczna, której brakuje w Rozprawie ułatwiłaby ocenę całościową ogólnego dorobku publikacyjnego.

Rozprawa składa się ze spisu treści oraz 10 rozdziałów. Kandydatka na stopień doktora przedstawia w niej wykaz stosowanych skrótów, analizę bibliometryczną (bez potwierdzenia formalnego) cyklu prac stanowiących rozprawę doktorską, publikacje wchodzące w skład cyklu prac, podsumowanie i wnioski, bibliografię, streszczenie w języku polskim, streszczenie w języku angielskim, opinię komisji bioetycznej, oświadczenia współautorów publikacji oraz całościowy dorobek kandydatki. W tym ostatnim, Autorka wskazuje na udział w publikacjach nie wchodzących w skład cyklu będącego podstawą niniejszej Rozprawy. Jest to 5 publikacji z indeksacją IF oraz 8 bez nadanego wskaźnika.

Aplikantka wskazuje na udział w trzech konferencjach i współautorstwo w streszczeniach zjazdowych. Zawarta jest również informacja o udziale w dwu naukowych projektach 1 zewnętrznych (Źródła finansowania: Podkarpackie Centrum Innowacji oraz Ministra Nauki i Szkolnictwa Wyższego w ramach Programu „Nauka dla Społeczeństwa II. Doktorantka jest współautorką zgłoszenia

patentowego nr nr P.441769 („Sposób ekstrakcji substancji aktywnych z Błyskoporka podkorowego”). Aplikantka wykazuje szeroką działalność popularyzującą naukę, między innymi przez autorstwo artykułów popularnonaukowych, prelekcje czy wywiady.

W Rozprawie nie ma zawartych informacji o odbytych przez Aplikantkę stażach oraz działalności dydaktycznej.

Autorka Rozprawy umiejętnie wprowadziła czytelnika w tematykę badawczą, jednak z lekkim niedosytem jeśli chodzi o opis epidemiologiczny nowotworów, których linie komórkowe użyła do badań. Hipotezy i cele badawcze zostały postawione w sposób jasny, metody badawcze zostały dobrane prawidłowo i widoczny jest rozwój znajomości metod badawczych przez zastosowanie ich szerszego panelu w drugiej publikacji w stosunku do pierwszej składających się na cykl będący podstawą niniejszej Rozprawy. Sposób przedstawienia wyników jest przejrzysty, a one same w sobie są dość ciekawe w obliczu skłaniania się do poszukiwania naturalnych źródeł substancji przeciwnowotworowych. Autorka Rozprawy sformułowała wnioski na podstawie swoich wyników badań i odniosła je do doniesień literaturowych. Rozprawa doktorska zredagowana jest poprawnie, styl pisania jest jasny. W opracowaniu można odnaleźć drobne błędy gramatyczne czy stylistyczne.

Poniżej uwagi ogólne oraz szczegółowe dotyczące przedstawionej do recenzji Rozprawy.

1. Wykaz skrótów – brak baz danych, na podstawie których skróty zostały wyjaśnione.

2. To co rzuca się w oczy w Rozprawie doktorskiej to cykl prac będący jej podstawą. Składa się z dwu opublikowanych prac o łącznym wskaźniku wpływu $IF = 7,18$ oraz jednego artykułu nieopublikowanego, a będącego na etapie recenzji. Co więcej punktacja MNiSW dla czasopisma Saudi Journal of Biological Sciences jest przedstawiana jako 25 w roku publikacji, co wydaje się być poprawnym wpisem, jednak Autorka wskazuje, że obecnie czasopismo ma punktów 100. Jest zrozumiałym, że punktacja czasopism podlega fluktuacjom, jednak wiążącym wskaźnikiem punktacyjnym jest wartość z roku publikacji.

3. Wydaje się, że zamiast słowa 'czosnek' w zdaniu 'Równocześnie, czosnek może indukować śmierć komórek niezależnie od kaspazy, np. za pośrednictwem allicyny...' należałoby wpisać ekstrakty/wyciągi/substancje zawarte w czosnku. Ten tryb zapisu przewija się przez cały przedstawiony do recenzji tekst.

4. Autorka w Rozprawie zapisała: 'Badania dotyczące czosnku prowadzone przez zespół badawczy w którym uczestniczyłam od 2016 roku wykazały, że różne odmiany czosnku charakteryzują się znaczącymi różnicami w zawartości związków polifenolowych, co odpowiadało toksyczności ekstraktów' To zdanie jest niejasne.

5. Doktorantka w pracy napisała, że 'Nowotwory języka i jelita grubego należą do często diagnozowanych i trudnych w leczeniu typów raka. Brak jest tutaj konkretnych informacji o statystykach zachorowalności, śmiertelności, dostępnych metodach leczenia oraz wskazania przykładów potencjalnych terapii np., będących w fazie badań klinicznych. Co więcej informacje o konkretnych związkach pochodzenia naturalnego, które mogłyby być wykorzystywane w terapiach tych nowotworów, a były/są chociażby w I fazie badań byłoby cennym uzupełnieniem opisu dającego ten temat Doktorantka podjęła. Wskazywałoby to również na potencjalną wartość aplikacyjną badań wykonanych przez Panią Magister.

6. W akapicie dotyczącym celów pracy Autorka zapisuje: 'Próba powiązania zawartości flawonoidów z prozdrowotnymi właściwościami ekstraktów - publikacja 3' - należy się domyślać, że chodzi o ekstrakty z czosnku?

7. Publikacja 1.: W publikacji tej Doktorantka podjęła się oceny działania cytotoksycznego wodnych ekstraktów z czosnku oraz odmian czosnku zwyczajnego - polskiej Harnaś oraz hiszpańskiej Morado. Badania wykonała *in vitro* z zastosowaniem linii komórkowej ludzkiego raka płaskonabłonkowego języka SCC-15. Wykonała testy uwolnienia dehydrogenazy mleczanowej (LDH, ang. *lactate dehydrogenase*) do pożywki hodowlanej, wychwyty czerwieni obojętnej (ang. *Neutral Red Uptake Assay*), oznaczenie aktywności kaspazy-3, oraz testy z wykorzystaniem wskaźników fluorescencyjnych żywotności komórek z przyłożeniem odpowiednich metod. Swoimi badaniami doktorantka udowodniła między innymi, że ekstrakty czosnku powodują cytotoksyczność zależną od reaktywnych form tlenu. Co więcej stwierdziła, że ekstrakty z odmiany czosnku Harnaś mogą dłużej stymulować produkcję ROS w komórkach SCC-15. Ponadto, badane ekstrakty czosnku stymulowały cytotoksyczność zależną od ROS, jednak najwyższe stężenia badanych ekstraktów nie powodowały aktywacji kaspazy-3 charakterystycznej dla apoptozy. Autorka opisuje również, że indukowana śmierć komórkowa nie jest klasyczną apoptozą, lecz raczej formą ROS-zależnej śmierci alternatywnej np. nekrozą związaną z silnym oddziaływaniem ROS. W publikacji Autorka napisała, że zastosowano jednokierunkową analizę wariancji (ANOVA) z wielokrotnym porównaniem Tukeya, jednak nie jest napisane z jakiego oprogramowania skorzystano - jest to o tyle ważne dla procesu doktoryzowania się, że analizy statystyczne, są poniekąd ostatnim etapem prac badawczych i należy im się dokładny opis, taki jak w przypadku badań laboratoryjnych.

Publikacja 2.: Druga praca będąca podstawą przedstawianej tu Rozprawy dotyczy badania cytotoksyczności ekstraktów, tym razem pozyskanych z liofilizatów czosnku czterech odmian. Miała ona na celu zidentyfikowanie mechanizmów molekularnych odpowiedzialnych za ich działanie, ze szczególnym uwzględnieniem roli receptora PPARy. Jest to kontynuacja badań i o wiele bogatsze

opracowanie dotyczące właściwości przeciwnowotworowych czosnku w stosunku do pracy pierwszej, co wskazuje na rozwój w pracy naukowej Autorki. metody badawcze zostały poszerzone, między innymi o badanie ekspresji na poziomie mRNA i białka. Doktorantka przebadła ekspresję PPARy, mikrocząsteczkowego białka związanego z autofagią 1A (ang. *microtubule-associated protein 1 light chain 3*, LC3A,), dysmutazy nadtlenkowej (ang. *superoxide dismutase 1*, SOD1) oraz katalazy (ang. *catalase*, CAT) . Tym razem oprócz linii komórkowej SCC-15, do badania posłużyła również linia komórek raka jelita grubego CACO-2, a kontrolą były komórki linii prawidłowych fibroblastów. Doktorantka w toku badań wykazała, że wzrost poziomu reaktywnych form tlenu w stosunku do prawidłowych komórek fibroblastów był indukowany przez ekstrakty z odmiany Harnaś w komórkach jelita grubego. Doktorantka bardzo celnie tu zauważa, że stres oksydacyjny może być wykorzystywany terapeutycznie do selektywnego uszkodzania komórek nowotworowych. Doktorantka wskazuje również na potencjał w aktywacji kaspazy -3 ekstraktu z liofilizatu czosnku Ornak. Zwiększał on aktywność enzymu we wszystkich zastosowanych stężeniach (0,062, 0,125, 0,250, 0,500, and 1,000 mg/mL) w komórkach SCC-15. Natomiast, ekstrakt z czosnku Morado zwiększał aktywność kaspazy-3 we wszystkich zastosowanych stężeniach w komórkach fibroblastów. Doktorantka, w wyniku badań stwierdziła również, że ekstrakty z odmian Harnaś i Ornak wyraźnie obniżały poziom mRNA i białka PPARy w komórkach nowotworowych, natomiast Morado zwiększał ekspresję tego receptora w fibroblastach. Są to ciekawe obserwacje, ponieważ pożądanym jest aby ekstrakty - substancje w nich zawarte działały na komórki nowotworowe i aktywowały ich ścieżki molekularne związane z apoptozą, a jednocześnie nie wpływały uszkodzająco na komórki zdrowe.

Czy może Pani Magister odnieść się do tego zagadnienia w kontekście działania badanych ekstraktów?

Dalej, Doktorantka wykazała, że ekstrakty ze wszystkich odmian czosnku obniżają poziom mikrocząsteczkowego białka związanego z autofagią 1A w komórkach nowotworowych, oraz powodują wzrost poziomu enzymów antyoksydacyjnych, dysmutazy nadtlenkowej i katalazy. Z prezentowanych tu publikacji można wnioskować, że rodzaj użytego surowca do wytworzenia ekstraktu będzie wpływać na jego skład, a tym samym na aktywności względem poszczególnych komórek. W tym kontekście bardzo istotne są badania przeprowadzone przez Doktorantkę za pomocą chromatografii cieczowej. Pokazała, że różnice pomiędzy odmianami czosnku są widoczne w 4 zawartości katechiny, acacetyny, epikatechiny i naryngeniny, kemferolu i rutyny. W toku czytania przedstawianych opisów wyników nasuwa się myśl o badaniach dotyczących współdziałania poszczególnych składników z różnych odmian czosnku. Doktorantka słusznie zauważa, że dalsze badania molekularne powinny skupić się na synergii działania składników aktywnych i ich wpływie na szlaki komórkowe. Co prawda, Autorka wskazuje przede wszystkim czynnik PPARy, ale intuicja

naukowa podpowiada, że mogą to być również inne białka mające znaczenie w procesie nowotworzenia.

Publikacja nr 3.: Przy wątpliwościach dotyczących tego, czy słuszne jest nazwanie tej pracy publikacją (skoro jest nieopublikowana), należy zwrócić się z prośbą o wytłumaczenie dlaczego Doktorantka zdecydowała się na włączenie nieopublikowanej pracy do cyklu stanowiącego podstawę niniejszej Rozprawy doktorskiej? Przygotowany artykuł będący w recenzji jest obszernym przeglądem literaturowym obejmującym 269 pozycji piśmiennictwa. Zawiera on tabele i ryciny. Rozlegle traktuje o zawartości polifenoli w poszczególnych gatunkach czosnku jak również o ich rodzajach. Ciekawym wydaje się przedstawienie wpływu konkretnych polifenoli na szlaki komórkowe związane z nowotworzeniem oraz ich elementy molekularne. Autorka wskazuje wpływ związków polifenolowych na cykl komórkowy oraz czynniki szlaków molekularnych, między innymi takich jak MAPK, ERK, NF- κ B, STAT3, PI3K/AKT, Nrf2/ARE, BAX/BCL2. Jest to ciekawe podejście w obliczu coraz częstszego zwracania się badaczy na naturalne źródła terapii antynowotworowych w onkologii precyzyjnej. Pomimo widocznych zalet przygotowanej pracy, nadal pozostaje ona w cyklu jako nieopublikowana, czego nie można pominąć przygotowując niniejszą recenzję.

Autorka Rozprawy wskazuje również na ograniczenia Rozprawy w postaci między innymi braku badań *in vivo* lub klinicznych. Tak, jest to pewien niedosyt, jednak badania *in vivo* mogą być kolejnym etapem doświadczeń naukowych, natomiast badania kliniczne rządzą się nieco odmiennymi zasadami i obłożone są dodatkowymi wyzwaniami. Ponadto Autorka napisała „Choć badania *in vitro* dostarczają cennych informacji na temat mechanizmów molekularnych działania ekstraktów czosnkowych, ich wyniki nie zawsze w pełni odzwierciedlają złożoność organizmu żywego.” Wydaje się, że badania *in vitro* nigdy nie będą oddawały złożoności organizmu żywego, dlatego badania *in vivo* są kolejnym etapem sprawdzania postawionych hipotez i potwierdzenia wyników uzyskanych *in vitro* wpływu danego związku docelowo w organizmie żywym. Dalsze ograniczenia, które Doktorantka wymienia, a są to: ograniczona liczba badanych linii komórkowych, różnorodność fitochemiczna odmian czosnku, brak standaryzacji zawartości składników aktywnych w ekstraktach, potencjalna degradacja związków siarkowych, złożoność działania PPAR γ i jego różnorodna rola w nowotworach - w szerszym rozumieniu są poniekąd uzasadnieniem podejmowanych w rozprawie tematów, które są jak dotąd niewyjaśnione w sposób naukowy i mogą posłużyć jako formułowanie kolejnych hipotez badawczych.

Recenzowana rozprawa doktorska Pani mgr Urszuli Bindugi zatytułowana: „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*” spełnia warunki stawiane rozprawie doktorskiej zgodnie z art. 187 ustawy „Prawo o szkolnictwie wyższym i nauce” (Dz.U. 2023 poz. 742, z późn. zm.).

Biorąc powyższe pod uwagę, wnioskuję się do Rady Naukowej Dyscypliny Nauk Medycznych Wyższej Szkoły Informatyki i Zarządzania z siedzibą w Rzeszowie o dopuszczenie Pani mgr Urszuli Bindugi do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Anna Grenda