



UNIwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny

Laboratoryjnej

Zakład Bromatologii

15-222 Białystok, ul. Mickiewicza 2D

Tel./Fax. (85) 748-54-68; (85) 748-54-69

bromatos@umb.edu.pl

Białystok 22 listopada 2022 r.

Recenzja rozprawy doktorskiej mgr Karoliny Banyś pt.:

**„Wpływ nanogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego
indukowanego DMBA u szczurów”**

Od wielu lat choroby nowotworowe są drugą przyczyną zgonów w Polsce, po chorobach układu krążenia. Prognozuje się, że liczba zachorowań i zgonów na nowotwory złośliwe będzie systematycznie wzrastać i staną się one pierwszą przyczyną zgonów u osób przed 65. rokiem życia. Obserwowany w Polsce wzrost zachorowań na nowotwory jest wynikiem zmian demograficznych – starzenie się społeczeństwa, jak i skutkiem narażenia na czynniki ryzyka, szczególnie w wyniku zmian cywilizacyjnych i zanieczyszczenia środowiska. Nie mniej ważne są czynniki związane ze stylem życia, w tym nieodpowiednia dieta – m.in. niskie spożycie warzyw, owoców czy ryb, wzrost spożycia żywności wysoko przetworzonej, otyłość, brak aktywności fizycznej, nadużywanie wysokoprocentowych alkoholi, a także palenie papierosów. Powyższe czynniki, według Światowej Organizacji Zdrowia (WHO), mogą stanowić ponad 65% spośród wszystkich czynników ryzyka chorób nowotworowych. Pomimo postępu w dziedzinie onkologii i większej dostępności innowacyjnych metod leczenia liczba zgonów na nowotwory złośliwe w Polsce jest nadal wysoka. Jedną z głównych przyczyn dużej śmiertelności z powodu nowotworów jest mała liczba wykonywanych badań kontrolnych i w związku z tym zbyt późna diagnoza. Dlatego wprowadzenie programów profilaktycznych, mających na celu wczesną diagnostykę chorób nowotworowych jest niezwykle istotne.

Rak piersi należy do najczęstszych nowotworów złośliwych u kobiet. Choroba zazwyczaj przez długi czas nie daje żadnych objawów, a w momencie jej wykrycia często występują już przerzuty komórek nowotworowych do innych narządów. Dlatego najważniejszym czynnikiem warunkującym wyleczenie jest odpowiednio wczesna diagnoza, która możliwa jest dzięki odpowiedniej profilaktyce i regularnym badaniom. Najczęściej chorują kobiety po 50 roku życia, wzrost zachorowań obserwuje się między 50 a 70 rokiem życia, chociaż choroba może także występować u kobiet młodszych. Około 5-10% przypadków raka piersi warunkowana jest genetycznie. Najbardziej powszechnymi mutacjami genetycznymi związanymi z rakiem piersi są mutacje genu BRCA1 i BRCA2. Opisywanych jest wiele różnych czynników, które mogą wpływać na powstawanie raka piersi. Oprócz genetycznych wymienia się czynniki hormonalne, środowiskowe, czynniki związane z dietą, prokreacją, brak karmienia piersią czy narażenie na promieniowanie jonizujące. Należy jednak pamiętać, że u znacznej liczby kobiet, które zachorowały na raka

piersi nie występowały żadne czynniki ryzyka. Pomimo znacznego postępu w leczeniu nowotworów leczenie nie zawsze jest skuteczne a stosowane leki często powodują wiele działań niepożądanych, które są uciążliwe dla pacjentów. Dlatego wciąż poszukuje się nowych sposobów leczenia, w tym możliwości wykorzystania aktywnych związków pochodzenia naturalnego, które skutecznie mogłyby być stosowane np. w leczeniu uzupełniającym, łagodzeniu skutków ubocznych i wspomaganiu terapii. Badania naukowe wykazały przeciwnowotworowe działanie wielu związków występujących w produktach pochodzenia roślinnego, m.in. takich jak kurkumina, likopen, resweratrol, sulforafan, kwercetyna, polifenole z owoców granatu, składniki błonnika pokarmowego, polisacharydy występujące w grzybach i wielu innych, ze względu na obecność m.in. substancji o działaniu przeciwutleniającym, immunomodulującym i przeciwzapalnym. Najwięcej badań, wyjaśniających mechanizmy działania przeciwnowotworowego, zostało przeprowadzonych na liniach komórkowych, mniej na modelach zwierzęcych a jedynie działanie nielicznych związków zostało potwierdzone w badaniach klinicznych.

Genisteina zaliczana jest do grupy izoflawonów, a jej głównym źródłem w diecie jest soja i produkty sojowe. W licznych badaniach wykazano, że genisteina może wykazywać działanie przeciwnowotworowe min. poprzez indukowanie apoptozy, wpływ na cykl komórkowy, hamowanie procesu angiogenezy czy aktywność antyproliferacyjną, ale istnieją także doniesienia które nie potwierdziły tego efektu. Z drugiej strony dostępne są także dane potwierdzające pronowotworowe działanie genisteiny, szczególnie w typach nowotworów hormonozależnych. Część badaczy uważa, że w przewidywaniu kierunku działania genisteiny i osób, u których genisteina wywierałaby pozytywny efekt przeciwnowotworowy, istotne mogą być czynniki związane z nutrigenomiką.

W związku z powyższym podjęty przez Panią mgr Karolinę Banyś temat rozprawy doktorskiej jest jak najbardziej aktualny i uzasadniony.

Przedstawiona do oceny rozprawa doktorska została przygotowana pod kierunkiem dr hab. Barbary Bobrowskiej – Korczak w Zakładzie Bromatologii Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Praca jest przygotowana w formie monografii (160 stron), posiada typowy układ stosowany w rozprawach doktorskich, a mianowicie zawiera część teoretyczną, cel pracy, część doświadczalną, opis wyników, dyskusję, wnioski, piśmiennictwo, streszczenie w języku polskim i angielskim.

Głównym celem naukowym rozprawy doktorskiej była ocena działania nano-, mikro- i makrogenisteiny na rozwój i przebieg procesu nowotworowego indukowanego 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem u szczurów.

Na podstawie przeglądu dostępnej literatury, przedstawionego we wstępie dysertacji Doktorantka sformułowała 5 tez szczegółowych: 1. Suplementacja genisteiną wpływa na rozwój i przebieg procesu nowotworowego. 2. Genisteina ma wpływ na rozwój i przebieg kancerogenezy, a istotną rolę w tym procesie ogrywają procesy epigenetyczne. 3. Istotną rolę w rozwoju i przebiegu procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów może odgrywać wpływ genisteiny na zawartość i metabolizm kwasów tłuszczowych. 4. Istotną rolę w rozwoju procesu nowotworowego indukowanego DMBA u szczurów suplementowanych genisteiną może odgrywać stan zapalny. 5. Działanie genisteiny zależy od wielkości cząstek (nano-, mikro-, makro-) w jakich genisteina jest podawana zwierzętom doświadczalnym.

Badania zostały przeprowadzone z zastosowaniem modelu zwierzęcego. Materiałem biologicznym do badań były: mocz, surowica krwi oraz guzy pozyskane od samic szczurów szczepu Sprague-Dawley (n=32). Po 10 dniowym okresie adaptacji do warunków eksperymentu zwierzęta zostały losowo podzielone na 4 grupy: zwierzęta pozbawione suplementacji, zwierzęta suplementowane w dawce 0,2 mg/kg m.c. makro-, mikro- (587±83 nm), bądź nano- (92±41 nm) genisteiną. Genisteina zawieszona w 0,4 ml wody, podawana była zwierzętom za pomocą sondy dożołądkowej od 40 dnia życia do 20 tygodnia życia szczurów. W celu zachowania warunków eksperymentalnych, zwierzęta z grupy kontrolnej otrzymywały za pomocą sondy dożołądkowej 0,4 ml wody. W celu wywołania nowotworu sutka szczurom podano sondą dożołądkową DMBA. Na przeprowadzenie badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Warszawskim Uniwersytecie Medycznym nr 645/2018.

W badaniach zastosowano następujące techniki analityczne: chromatografię cieczową z detekcją spektrometrii mas, chromatografię gazową z detekcją spektrometrii mas, metody immunoenzymatyczne, chromatografię cieczową z detekcją UV oraz metodę spektrofotometryczną.

Zastosowana w pracy metodyka, w tym zaplanowanie eksperymentu badawczego i poprawność wykonania kolejnych jego etapów nie budzą wątpliwości. Jeśli w opisie metodyki na str. 51 podano skrót metody LC-MS/MS to można go było też użyć na następnej stronie, przy czym na str. 51 powinien być podany producent chromatografu. Podobnie na str. 53 brakuje producenta chromatografu GC-TOF-MS. Producenci zastosowanych odczynników również podani są wybiórczo, np. genisteiny na str. 48 czy DMBA na str. 50, natomiast przy większości zastosowanych odczynników nie podano producenta.

Uzyskane wyniki badań zestawiono w 19 tabelach oraz na 31 starannie przygotowanych rycinach.

Na uwagę zasługuje estetyka przygotowanej dysertacji - staranne, czytelne ryciny i wykresy, także w części wprowadzającej, schemat przeprowadzonych eksperymentów oraz graficzne przedstawienie wyników ułatwiają czytającemu przeanalizowanie najważniejszych rezultatów z wykonanych badań.

Dyskusja jest napisana dojrzałym językiem naukowym, Doktorantka umiejętnie konfrontuje uzyskane wyniki z badaniami innych autorów.

Pracę kończy 6 jasno sformułowanych wniosków, wynikających z przeprowadzonych badań. Wniosek 6 brzmi: „Suplementacja zwierząt nano-, mikro- i makrogenisteiną ma wpływ zarówno na rozwój procesu nowotworowego, jak również na stężenia wybranych markerów w płynach biologicznych szczurów traktowanych 7,12-dimetylobenzo[a]antracenenem. Poznanie mechanizmów działania genisteiny w oparciu o analizę wybranych biomarkerów wydaje się mieć ogromne znaczenie w ocenie bezpieczeństwa jej stosowania. Istnieje potrzeba prowadzenia dalszych badań w tym kierunku.” W związku z powyższym proszę o wskazanie jakie dalsze badania można byłoby przeprowadzić w celu oceny bezpieczeństwa stosowania genisteiny?

W pracy wykorzystano 336 pozycji poprawnie dobranego piśmiennictwa, z których 60% pochodzi z ostatnich 10 lat. Na str. 154 zamiast pozycji [354], powinno być [334].

Z obowiązku recenzenta przedstawiam kilka uwag, które dotyczą głównie błędów edytorskich, stylistycznych i niefortunnnych sformułowań, których Doktorantka się nie ustrzegła.

We wstępie pracy (str. 6) cel badań można było pominąć, celowi pracy jest poświęcony oddzielny rozdział monografii.

Sformułowanie użyte na str. 7: „w ramach walki z rakiem piersi” jest zbyt potoczne, należałoby zmienić.

Styl zdania na str. 8: „...nadmierne spożywanie tłuszczu, spożywaniem alkoholu oraz występowaniem nadwagi i otyłości, ma związek ze wzrostem ryzyka zachorowania...” należałoby poprawić. Podobnie na str. 16: „Biorąc pod uwagę powyższej przedstawione...”

Błędy literowe: str. 36: „Genisteina znalazła również zastawanie...”, str. 40: (2-krotnie) „przedmenopauzą”, str. 41: „...uzasadnione zdaje się być przeprowadzenie dotykowych badań.....w celu wyjaśnienie działania”, str. 44: „naekspresja”, „celem terapeutyczny”, str. 108 „kielki kończyny”, ekstrakt z soi”, str. 143: „pleotropic”

We wstępie (str. 5) i dyskusji (str. 108) oraz we wstępie streszczenia pracy niektóre zdania brzmią identycznie, należałoby unikać powtórzeń takich samych zdań.

Pewną wątpliwość budzi strona tytułowa rozprawy. Podawanie kierunku Farmacja w rozprawie doktorskiej wydaje się zbędne. Bardziej poprawne byłoby podanie dyscypliny: nauki farmaceutyczne lub „Rozprawa doktorska na stopień doktora nauk farmaceutycznych”. Tytuł rozprawy w mojej opinii nieco zawęża jej treść, ponieważ oprócz nanogenisteiny przebadano również mikro- i makrogenisteinę.

Spis piśmiennictwa jest przerwany, po poz. 323 wstawiono streszczenie w języku angielskim i polskim (wszyscy odwrotnie), a następnie dalej kontynuowany jest wykaz literatury. Wynika to z błędu introligatorskiego podczas składania i oprawiania pracy, powyższa uwaga nie ma wpływu na ocenę merytoryczną dysertacji.

Podsumowując, z pełnym przekonaniem stwierdzam, iż założenia i cel pracy zostały w pełni zrealizowane, a uzyskane z badań wyniki i wnioski niewątpliwie posiadają aspekt praktyczny. Realizacja badań wymagała od Doktorantki dużego nakładu pracy i pełnego zaangażowania w realizowane badania. Uważam, że przedstawiona do recenzji dysertacja spełnia ustawowe, z uwzględnieniem art. 13. ust. 1 Ustawy z dnia 14 marca 2003 roku (z późniejszymi zmianami) o stopniach naukowych i tytułach naukowych oraz stopniach i tytułach w zakresie sztuki oraz zwyczajowe wymagania stawiane rozprawom doktorskim. W związku z powyższym, przedkładam wniosek do Rady Dyscypliny Nauk Farmaceutycznych Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego o dopuszczenie Pani mgr Karoliny Banyś do dalszych etapów przewodu doktorskiego.

Biorąc pod uwagę aspekt praktyczny, kompleksowość przeprowadzonych badań i uzyskane rezultaty, które wskazują, że niewątpliwie powinno się rozważyć bezpieczeństwo stosowania preparatów zawierających genisteinę, szczególnie w postaci nanocząstek, zwracając uwagę na istotę problemu, ponieważ nanocząstki są obecnie używane w wielu gałęziach przemysłu, wnioskuję o wyróżnienie rozprawy doktorskiej.